



**UÇUCU YAĞ İÇEREN EMÜLSİFİYE SİSTEMLERİN  
SANTRAL SİNİR SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
*İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Doktora Tezi**

**Nursenem KARACA**

**Eskişehir 2021**

**UÇUCU YAĞ İÇEREN EMÜLSİFİYE SİSTEMLERİN  
SANTRAL SİNİR SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
*İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nursenem KARACA**



**DOKTORA TEZİ**

**Farmakognozi Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ**

**Eskişehir  
Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Aralık 2021**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nursenem KARACA'nın "Uçucu Yağ İçeren Emülsifiye Sistemlerin Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkilerinin *in vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 30/12/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

| <u>Jüri Üyeleri</u> | <u>Unvanı Adı Soyadı</u>     | <u>İmza</u> |
|---------------------|------------------------------|-------------|
| Üye (Tez Danışmanı) | : Prof. Dr. Fatih Demirci    | .....       |
| Üye                 | : Prof. Dr. Gökalep İşcan    | .....       |
| Üye                 | : Prof. Dr. Oğuz Bayraktar   | .....       |
| Üye                 | : Prof. Dr. Nevzat Konar     | .....       |
| Üye                 | : Prof. Dr. Müzeyyen Demirel | .....       |

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### UÇUCU YAĞ İÇEREN EMÜLSİFİYE SİSTEMLERİN SANTRAL SİNİR SİSTEMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Nursenem KARACA

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2021

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Uçucu yağların suda çözünürlüklerinin düşük olması, yüksek uçuculuk özellikleri ve kararsızlıkları, formülasyonları ile ilgili çalışmaları sınırlamaktadır. Uçucu yağların nanoemülsiyonlarının oluşturulması ile, bu problemlerin üstesinden gelindiği bilinmektedir. Bu çalışmada ise *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye, Lamiaceae) ve *Coriandrum sativum* L. (Kişniş, Apiceae) uçucu yağları ve bunların birleşimlerinin nanoemülsiyonları oluşturularak santral sinir sistemi (SSS)'ne yönelik *in vitro* anti-enflamatuvar ve antikolinesteraz etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada, farmasötik kalitede biberiye ve kişniş uçucu yağlarının kimyasal içerikleri GK-AİD ve GK/KS yöntemleriyle belirlenmiştir. Su titrasyonu yöntemi ile Y/S emülsiyonları elde edilmiştir. Emülsiyonların damlacık boyutu, PDİ, zeta potansiyeli ve bulanıklık ölçümü ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hızlı stabilizasyon testleri kapsamında santrifüjleme, dondurma ve ısıtmaya direnç belirlenmiştir. Uçucu yağların ve emülsiyonların *in vitro* 5-lipoksijenaz inhibisyonu testi ile anti-enflamatuvar etkileri belirlenerek karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Son olarak, stabil nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* antikolinesteraz etkileri tespit edilmiştir.

Emülsiyon formülasyonları, farmakope kalitesinde biberiye (%44,1 1,8-sineol) ve kişniş (%74,9 linalol) uçucu yağlarından ve bunların eşit orandaki birleşimlerinden başarıyla elde edilmiştir. Sonuçta, 5 farklı emülsiyon stabil bulunmuştur. Ayrıca, kişniş uçucu yağının anti-enflamatuvar etkisi nanoemülsiyon formülasyonu ile artırılmıştır. Bununla birlikte, formülasyonların kolinesteraz inhibisyon etkilerinde önemli bir fark kaydedilmemiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Nanoemülsiyon, Uçucu yağ, Biberiye, Kişniş, Lipoksijenaz inhibisyonu, Kolinesteraz inhibisyonu

## ABSTRACT

### IN VITRO EVALUATION OF THE EFFECTS OF ESSENTIAL OIL EMULSIFIED SYSTEMS ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Nursenem KARACA

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December 2021

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

The low water solubility, high volatility and instability of essential oils limit the studies on their formulations. It is known that these problems are managed by the formulation of essential oils nanoemulsions. In this study, *in vitro* anti-inflammatory and anticholinesterase effects on the central nervous system (CNS) were investigated by forming nanoemulsions of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary, Lamiaceae) and *Coriandrum sativum* L. (Coriander, Apicaceae) essential oils and their combinations.

In this study, chemical contents of rosemary and coriander essential oils were determined by GK-AID and GK/KS methods. O/W emulsions were obtained by water titration method. Characterization studies were carried out by measuring the droplet size, PDI, zeta potential and turbidity of the emulsions. Resistance to centrifugation, freezing and heating was determined as rapid stabilization tests. *In vitro* 5-lipoxygenase inhibition of essential oils and emulsions were determined and evaluated comparatively. Finally, *in vitro* anticholinesterase effects of stable nanoemulsion formulations were determined.

The Pharmacopoeia complying rosemary (44.1% 1,8-cineol) and coriander (74.9% linalool) essential oils, and their resulting emulsion formulations obtained were successfully. As an overall result, no changes were observed in 5 different nanoemulsions after stability tests. In addition, the anti-inflammatory effect of coriander essential oil was increased by nanoemulsion. However, there was no significant difference in the cholinesterase inhibition effects of the oil formulations.

**Keywords:** Nanoemulsion, Rosemary, Coriander, Essential oil, Lipoxygenase inhibition, Cholinesterase inhibition

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam boyunca öncelikle bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren sevgili tez danışmanım Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye ve hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Neşe KIRİMER ve Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, geçirdiğim zorlu günlerde yanımda olan ekip arkadaşlarıma sağladıkları destekler ve gösterdikleri sabırlar için teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam boyunca her türlü laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, “Farmakognozi, Biyokimya, Farmasötik Teknoloji ve Farmasötik Kimya Anabilim Dalı”na,

Tezimin son haline gelmesinde büyük katkıları olan Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Beni Farmakognozi ile tanıştıran Dr. Yasemin BALK'a, her türlü manevi desteği sağlayan annem, babam, sevgili eşim Ecz. Erkan KARACA'ya ve küçük kızıma teşekkürlerimi sunarım.

Nursenem KARACA

Aralık 2021

## **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 intihal 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.



## İÇİNDEKİLER

|                                                                 | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                            | i            |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....                                      | ii           |
| ÖZET.....                                                       | iii          |
| ABSTRACT .....                                                  | iv           |
| TEŞEKKÜR.....                                                   | v            |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....                | vi           |
| İÇİNDEKİLER .....                                               | vii          |
| TABLolar DİZİNİ.....                                            | xii          |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                           | xiii         |
| GÖRSELLER DİZİNİ.....                                           | xiv          |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                            | xvi          |
| 1. GİRİŞ.....                                                   | 1            |
| 1.1. Nanoteknoloji.....                                         | 2            |
| 1.2. Emülsiyonlar ve sınıflandırılmaları.....                   | 3            |
| 1.2.1. Klasik emülsiyonlar.....                                 | 3            |
| 1.2.2. Nanoemülsiyonlar.....                                    | 4            |
| 1.2.3. Mikroemülsiyonlar.....                                   | 5            |
| 1.2.4. Nanoemülsiyon ve mikroemülsiyon arasındaki farklar.....  | 6            |
| 1.3. Nanoemülsiyonların Formülasyonu.....                       | 8            |
| 1.3.1. Nanoemülsiyon eldesinde kullanılan sürfaktan maddeler... | 9            |
| 1.4. Nanoemülsiyonların Elde Edilme Yöntemleri.....             | 12           |
| 1.4.1. Yüksek enerjili emülsifikasyon yöntemleri.....           | 12           |
| 1.4.1.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon.....                    | 12           |

|                                                                                        | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.4.1.2. <i>Mikroakışkanlaştırma</i> .....                                             | 13           |
| 1.4.1.3. <i>Ultrasonikasyon</i> .....                                                  | 13           |
| 1.4.2. Düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleri.....                                   | 13           |
| 1.4.2.1. <i>Faz dönüşümü sıcaklığı (Phase Inversion Temperature-PIT) yöntemi</i> ..... | 14           |
| 1.4.2.2. <i>Kendiliğinden emülsifikasyon (Su titrasyonu) yöntemi</i> .....             | 14           |
| 1.5. Emülsiyonların Stabilitesi.....                                                   | 15           |
| 1.5.1. Kremalaşma ve sedimentasyon.....                                                | 15           |
| 1.5.2. Flokülasyon (Topaklanma).....                                                   | 15           |
| 1.5.3. Koalesans (Birleşme).....                                                       | 16           |
| 1.5.4. Ostwald olgunlaşması.....                                                       | 16           |
| 1.5.5. Faz dönüşümü.....                                                               | 17           |
| 1.6. Nanoemülsiyonların Karakterizasyonu.....                                          | 17           |
| 1.6.1. Damlacık boyutu ve boyut dağılımı.....                                          | 17           |
| 1.6.2. Viskozite.....                                                                  | 19           |
| 1.6.3. Elektriksel özellikler (Zeta potansiyeli) .....                                 | 19           |
| 1.6.4. Bulanıklık (Türbidite).....                                                     | 20           |
| 1.7. Nanoemülsiyonların Potansiyel Toksisitesi.....                                    | 20           |
| 1.8. Uçucu Yağlar ve Emülsiyonları.....                                                | 21           |
| 1.9. Emülsiyonların Uygulamaları.....                                                  | 22           |
| 1.9.1. Topikal yol.....                                                                | 22           |
| 1.9.2. İntranazal yol.....                                                             | 22           |
| 1.9.3. Parenteral yol.....                                                             | 24           |
| 1.9.4. Antimikrobiyal nanoemülsiyonlar.....                                            | 25           |
| 1.9.5. Fitofarmasötikler ve nanoemülsiyonlar.....                                      | 26           |

|                                                                      | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.10. Santral Sinir Sistemi (SSS) ve Nanoteknoloji.....              | 26           |
| 1.10.1. SSS’de anti-enflamatuvar etki.....                           | 27           |
| 1.10.2. SSS’de antikolinesteraz etki.....                            | 28           |
| 1.11. Bitkisel hammaddelerin SSS’ye etkileri.....                    | 29           |
| 1.11.1. Uçucu yağların SSS etkileri.....                             | 38           |
| 1.11.2. Tez kapsamında kullanılan bitkisel hammaddeler.....          | 39           |
| 1.11.2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....                       | 39           |
| 1.11.2.2. <i>Coriandrum sativum</i> L.....                           | 40           |
| 1.11.2.3. <i>Sesamum indicum</i> L.....                              | 41           |
| 2. YÖNTEM.....                                                       | 43           |
| 2.1. Kullanılan Kimyasallar.....                                     | 43           |
| 2.2. Kullanılan Cihazlar.....                                        | 43           |
| 2.3. Emülsiyonların Elde Edilmesinde Kullanılan Yağlar.....          | 44           |
| 2.4. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Analizi.....                           | 44           |
| 2.4.1. Gaz kromatografisi (GK)/Alev iyonizasyon dedektörü (AİD)..... | 44           |
| 2.4.2. Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi (GK/KS).....          | 44           |
| 2.4.3. Susam yağının metillenmesi.....                               | 44           |
| 2.5. Yağların Çözünürlüğü.....                                       | 45           |
| 2.6. Emülsiyonların Su Titrasyonu Yöntemi ile Elde Edilmesi.....     | 45           |
| 2.7. Hızlandırılmış Stabilité Çalışmaları.....                       | 46           |
| 2.7.1. Emülsiyonların santrifüj edilmesi.....                        | 46           |
| 2.7.2. Dondurma-çözdürme stabilitesi.....                            | 47           |
| 2.7.3. Isıtma-soğutma stabilitesi.....                               | 47           |
| 2.8. Emülsiyonların Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....  | 47           |
| 2.8.1. Emülsiyonların dış görünüşleri.....                           | 47           |
| 2.8.2. Emülsiyonların bulanıklık analizi.....                        | 48           |

|                                                                                             | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.8.3. Emülsiyon tipinin belirlenmesi.....                                                  | 49           |
| 2.8.4. Reolojik analiz (Viskozite ölçümü).....                                              | 49           |
| 2.8.5. Damlacık boyutu ve polidispersite indeksinin belirlenmesi                            | 49           |
| 2.8.6. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi.....                                     | 49           |
| 2.9. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....                                                    | 50           |
| 2.9.1. <i>İn vitro</i> anti-enflamatuvar aktivitenin belirlenmesi.....                      | 50           |
| 2.9.2. <i>İn vitro</i> antikolinesteraz aktivitenin belirlenmesi.....                       | 50           |
| 3. BULGULAR VE YORUM.....                                                                   | 52           |
| 3.1. Uçucu ve Sabit Yağ Bileşenlerinin Analiz Sonuçları.....                                | 52           |
| 3.1.1. <i>Coriandrum sativum</i> (Kışniş) uçucu yağının fitokimyasal bileşenleri.....       | 52           |
| 3.1.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Biberiye) uçucu yağının fitokimyasal bileşenleri..... | 53           |
| 3.1.3. <i>Sesamum indicum</i> (Susam) yağının fitokimyasal bileşenleri.....                 | 54           |
| 3.2. Yağların Sürfaktandaki Çözünürlüğü.....                                                | 55           |
| 3.3. Emülsiyonların Su Titrasyonu Yöntemi ile Elde Edilmesi.....                            | 56           |
| 3.3.1. <i>Coriandrum sativum</i> (Kışniş) uçucu yağı emülsiyonları..                        | 61           |
| 3.3.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Biberiye) uçucu yağı emülsiyonları.....               | 63           |
| 3.3.3. Biberiye ve kışniş uçucu yağı (1:1) emülsiyonları.....                               | 66           |
| 3.3.4. Oleik asit emülsiyonları.....                                                        | 68           |
| 3.3.5. Susam yağı emülsiyonları.....                                                        | 70           |
| 3.4. Stabil Emülsiyonlarda Yapılan Ölçümler.....                                            | 71           |
| 3.4.1. Emülsiyon tip tayini sonuçları.....                                                  | 72           |
| 3.4.2. Reolojik ölçüm (Viskozite) sonuçları.....                                            | 72           |
| 3.4.3. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) sonuçları.....                                   | 74           |

|                                                                                          | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....                                                 | 74           |
| 3.5.1. <i>In vitro</i> anti-enflamatuvar aktivite sonuçları.....                         | 75           |
| 3.5.1.1. <i>Damlacık boyutunun anti-enflamatuvar aktivite sonuçlarına etkileri</i> ..... | 78           |
| 3.5.2. <i>In vitro</i> antikolinesteraz etki sonuçları.....                              | 80           |
| 4. GENEL DEĞERLENDİRME.....                                                              | 83           |
| KAYNAKÇA.....                                                                            | 86           |
| EKLER                                                                                    |              |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                 |              |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                              | <b><u>Sayfa</u></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Tablo 1.1.</b> Mikroemülsiyon ve nanoemülsiyonların karşılaştırılmaları (Setya vd., 2014; Bilia vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012)..... | 8                   |
| <b>Tablo 1.2.</b> Anadolu’da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri.....   | 30                  |
| <b>Tablo 2.1.</b> 1:9 (a:a) oranında yağ:süpfaktan içeren emülsiyonlardaki yağ, süpfaktan ve su miktarları.....                              | 46                  |
| <b>Tablo 2.2.</b> 2:8 (a:a) oranında yağ:süpfaktan içeren emülsiyonlardaki yağ, süpfaktan ve su miktarları.....                              | 46                  |
| <b>Tablo 2.3.</b> 3:7 (a:a) oranında yağ:süpfaktan içeren emülsiyonlardaki yağ, süpfaktan ve su miktarları.....                              | 46                  |
| <b>Tablo 3.1.</b> Kişniş uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS sonuçları.....                                                                        | 53                  |
| <b>Tablo 3.2.</b> Biberiye uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS sonuçları.....                                                                      | 53                  |
| <b>Tablo 3.3.</b> Susam yağı bileşimi ve literatür ile karşılaştırılması.....                                                                | 55                  |
| <b>Tablo 3.4.</b> Yağların süpfaktan maddelerdeki oransal çözünürlükleri.....                                                                | 56                  |
| <b>Tablo 3.5.</b> Stabil olduğu tespit edilen emülsiyonların viskozite değerleri                                                             | 72                  |
| <b>Tablo 3.6.</b> Uçucu yağların, emülsiyonların ve standart madde NDGA’nın karşılaştırmalı lipoksijenaz inhibisyonu sonuçları               | 77                  |
| <b>Tablo 3.7.</b> Nanoemülsiyon formülasyonlarının görünümüleri, damlacık boyutları, PDİ ve zeta potansiyel değerleri.....                   | 79                  |
| <b>Tablo 3.8.</b> Uçucu yağların, emülsiyonların ve standart maddelerin karşılaştırmalı kolinesteraz inhibisyonu sonuçları.....              | 81                  |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                   |                                                                                                                                                      | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Şekil 1.1.</b> | Emülsiyon tipleri; a. Su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu, b. Yağ içinde su (S/Y) emülsiyonu (Chime vd., 2014).....                                       | 4                   |
| <b>Şekil 1.2.</b> | Emülsiyonların sınıflandırılması a. Klasik emülsiyon, b. Nanoemülsiyon, c. Mikroemülsiyon (Piorkowski ve McClements, 2014; Kale ve Deore, 2017)..... | 7                   |
| <b>Şekil 1.3.</b> | Küçük molekül sürfaktan maddenin yapısı ve sürfaktanların oluşturduğu emülsiyon damlacığı (Lawrence ve Rees, 2000).                                  | 10                  |
| <b>Şekil 1.4.</b> | İyonik olmayan sürfaktanlardan Tween 20, Tween 80, Span 20 ve Span 80'nin kimyasal yapısı (Takamura vd., 1979; Wang, 2014).....                      | 11                  |
| <b>Şekil 1.5.</b> | Emülsiyonlarda destabilizasyon çeşitleri; a) Faz ayrımı, b) Koalasens, c) Kremalaşma, d) Flokülasyon, e) Ostwald olgunlaşması (Robins, 2000) .....   | 16                  |
| <b>Şekil 1.6.</b> | Koku bileşenlerinin inhalasyon yoluyla beyne ulaşması (Aderibigbe, 2018).....                                                                        | 23                  |
| <b>Şekil 3.1.</b> | Stabil olduğu tespit edilen nanoemülsiyonlara ait reogramlar.                                                                                        | 73                  |

## GÖRSELLER DİZİNİ

|                     |                                                                                                                                                            | <u>Sayfa</u> |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Görsel 1.1.</b>  | Biberiye ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) çiçekli dalları ve toprak üstü kısımları.....                                                                 | 40           |
| <b>Görsel 1.2.</b>  | Kişniş ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) meyveleri.....                                                                                                      | 41           |
| <b>Görsel 1.3.</b>  | Susam ( <i>Sesamum indicum</i> L.) tohumları.....                                                                                                          | 42           |
| <b>Görsel 2.1.</b>  | Yağ:sürfaktan karışımlarının formülasyon öncesi görüntüleri.....                                                                                           | 48           |
| <b>Görsel 2.2.</b>  | Yağ damlacığı boyutu ve konsantrasyonu ile emülsiyon görünümünün değişimi (sodan sağa doğru; şeffaf, yarı şeffaf, bulanık ve süt görünümlü emülsiyon)..... | 48           |
| <b>Görsel 3.1.</b>  | Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (1:9; a:a) içeren K1 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                    | 62           |
| <b>Görsel 3.2.</b>  | Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (2:8; a:a) içeren K2 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                    | 63           |
| <b>Görsel 3.3.</b>  | Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) içeren K3 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                    | 63           |
| <b>Görsel 3.4.</b>  | Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (1:9; a:a) içeren R1 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                  | 64           |
| <b>Görsel 3.5.</b>  | Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (2:8; a:a) içeren R2 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                  | 65           |
| <b>Görsel 3.6.</b>  | Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) içeren R3 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                  | 65           |
| <b>Görsel 3.7</b>   | Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı:Tween 20 (1:9; a:a) içeren RK1 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                | 66           |
| <b>Görsel 3.8.</b>  | Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı:Tween 20 (2:8; a:a) içeren RK2 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                | 67           |
| <b>Görsel 3.9.</b>  | Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) içeren RK3 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                | 68           |
| <b>Görsel 3.10.</b> | Oleik asit:Tween 20 (1:9; a:a) içeren O1 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                           | 68           |
| <b>Görsel 3.11.</b> | Oleik asit:Tween 20 (2:8; a:a) içeren O2 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                           | 69           |
| <b>Görsel 3.12.</b> | Oleik asit:Tween 20 (3:7; a:a) içeren O3 serisi emülsiyonların görünümüleri.....                                                                           | 70           |

|                     |                                                                                             |    |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Görsel 3.13.</b> | 1:9 (a:a) oranında Susam yağı:Tween 20/Span 80 (1/1) içeren emülsiyonların görünüşleri..... | 70 |
| <b>Görsel 3.14.</b> | 2:8 (a:a) oranında Susam yağı:Tween 20/Span 80 (1/1) içeren emülsiyonların görünüşleri..... | 71 |
| <b>Görsel 3.15.</b> | 3:7 (a:a) oranında Susam yağı:Tween 20/Span 80 (1/1) içeren emülsiyonların görünüşleri..... | 71 |
| <b>Görsel 3.16.</b> | K2-4 formülasyonunun geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.....                   | 74 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                  |                                                                    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| a/h              | : Ağırlık/hacim                                                    |
| AChE             | : Asetilkolinesteraz                                               |
| AİD              | : Alev iyonizasyon dedektörü                                       |
| ATC              | : Asetiltiyokolin                                                  |
| BuChE            | : Butirilkolinesteraz                                              |
| BTC              | : Bütiriltiyokolin                                                 |
| COX              | : Siklooksijenaz                                                   |
| cP               | : Centipoise                                                       |
| dk               | : Dakika                                                           |
| DMSO             | : Dimetil sülfoksit                                                |
| DLS              | : Dinamik ışık saçılımı                                            |
| DTNB             | : 3-Karboksi-4-nitrofenil disülfid                                 |
| EC <sub>50</sub> | : Etkili konsantrasyonun yarısı                                    |
| FDA              | : Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration)      |
| GABA             | : gama-aminobutirik asit                                           |
| GK               | : Gaz kromatografisi                                               |
| GRAS             | : Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Recognized As Safe) |
| HLB              | : Hidrofil-lipofil denge (Hydrophilic-lipophilic balance)          |
| KBB              | : Kan-beyin bariyeri                                               |
| KS               | : Kütle spektroskopisi                                             |
| LOX              | : Lipoksijenaz                                                     |
| MAO              | : Monoaminoksidaz                                                  |
| MCT              | : Orta zincirli trigliseritler (Medium chain triglycerides)        |
| M.Ö.             | : Milattan önce                                                    |
| MS               | : Multipl skleroz                                                  |
| nab              | : Albümin tabanlı nanopartikül teknolojisi                         |
| NDGA             | : Nordihidroguairatik asit                                         |
| PDI              | : Polidispersite İndeksi                                           |
| PIT              | : Faz dönüşümü sıcaklığı (Phase Inversion Temperature)             |
| pI               | : Izoelektrik nokta                                                |
| PSI              | : İnç kareye uygulanan kuvvet (Pounds per Square Inch)             |
| rpm              | : Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)                 |

|      |                                                                    |
|------|--------------------------------------------------------------------|
| RRI  | : Rölatif tutunma indisi (Relative retention indices)              |
| SEM  | : Taramalı elektron mikroskobu (Scaning Electron Microscope)       |
| SLS  | : Statik ışık saçılımı (Static Light Scattering)                   |
| sn   | : Saniye                                                           |
| SPE  | : Katı faz ekstraksiyon (Solid-phase extraction)                   |
| SSS  | : Santral sinir sistemi                                            |
| std  | : standart sapma                                                   |
| S/Y  | : Yağ içinde su                                                    |
| TEM  | : Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscopy) |
| U/mg | : Unite/miligram                                                   |
| UV   | : Ultraviyole                                                      |
| Y/S  | : Su içinde yağ                                                    |

## 1. GİRİŞ

Nanoemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar genellikle 1-100 nm çapında yağ damlacıkları içeren stabil (kararlı) emülsiyonlar olarak tanımlanmaktadır (Kumar ve Mittal, 1999; Kale ve Deore, 2017). Son yıllarda lipofilik maddelerin çözünürlüğünü ve stabilitelerini arttırmak için farmasötik, gıda ve diğer endüstriyel alanlarda emülsiyonların kullanılması ilgi çekmektedir. Yüksek optik berraklık ve uzun süreli stabilite gibi özelliklere sahip nanoemülsiyonlar lipofilik ilaçların suda çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmak, aktif bileşenleri çevresel etkenlerden korumak ve taşımak için yüksek potansiyele sahiptirler (Lawrence ve Rees, 2000). Bu tür nano- ve/veya mikro iletim sistemleri, tüm bileşenlerin (su, yağ ve sürfaktan madde) bir araya getirilmesiyle karıştırma veya ısı kullanılarak kendiliğinden oluşturulabilir (Bilia vd., 2014).

Bitkisel preparatların lipit nanoemülsiyonları halinde kullanımları ile; çözünürlüğün arttırıldığı, yan etkilerinin azaltıldığı, biyoyararlanımının arttırıldığı ve klasik emülsiyonlar gibi formülasyonlara kıyasla farmakolojik etkilerinin uzatıldığı gösterilmiştir (Chime vd., 2014). Bilindiği üzere, uçucu yağlar, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde özellikle de aromaterapi uygulamalarında kullanılmaktadır. Uçucu yağların uyku, psikoloji, davranış, algı, konvülsif/antikonvülsif etkileri, epilepsi tedavisi, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi santral sinir sistemi etkileri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır (Buchbauer ve Başer, 2020; Barbosa Filho vd., 2006; de Moura Linck vd., 2009; Dobetsberger ve Buchbauer, 2011; Emamghoreishi vd., 2005; Gastón vd., 2016; Komori vd., 2006; Sayorwan vd., 2012). Ancak, uçucu yağların suda çözünürlüklerinin düşük olması ve kararsızlığı, yüksek uçuculuk özellikleri ve bazı yan etkileri nedenleriyle tedavideki uygulamaları sınırlanmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ve uçucu yağların “nano” formülasyonlarının elde edilmesi ile bu sınırlamaları aşmak mümkün olmuştur. Uçucu yağların mikro- ve nanoemülsiyonlarının hazırlanması; salımı kontrol etmek, fiziksel stabiliteyi arttırmak, çevre ile olan etkileşimlerden korumak, uçuculuklarını azaltmak, biyolojik aktivitelerini arttırmak ve toksisiteyi azaltmak gibi birçok avantaj sağlanmaktadır (Bilia vd., 2014; Saraf, 2010).

Bu tez projesinin amacı;

- Santral sinir sistemine etkili olduğu bilinen ve halk arasında bu amaçla kullanılan; farmasötik kalitedeki *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) ve *Coriandrum sativum* L. (kişniş) uçucu yağları ve eşit kombinasyonlarının su titrasyonu yöntemi ile su içinde yağ (Y/S) emülsiyonlarını elde etmek,

- Santrifüjleme, dondurma-çözdürme ve ısıtma-soğutma tesleri ile stabil emülsiyonu belirlemek ve karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek,
- Saf uçucu yağların, eşit kombinasyonlarının ve bunlardan elde edilen nanoemülsiyonların *in vitro* anti-enflamatuvar etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek,
- Stabil olduğu belirlenen emülsiyonların *in vitro* asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyonlarının sonuçları ile birlikte damlacık boyutları ve emülsiyondaki uçucu yağ konsantrasyonlarını değerlendirerek intranazal kullanıma yönelik ön çalışma niteliğinde aktif emülsiyonu belirlemektir.

### 1.1. Nanoteknoloji

En genel ve kapsamlı tanımlardan biri olarak; nanoteknoloji; atomsal, moleküler yapılar düzeyinde fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir. Özellikle, son 20 yılda nanoteknolojik gelişmelerde hızlı bir artış gözlenmekte ve bu alandaki yatırımlar günden güne artmaktadır. Bunun yanında, sağlık bilimlerinde ve biyoteknoloji alanlarında nanopartikül sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli ölçüde artış olmuştur. Nanopartiküllerin, çeşitli ilaç moleküllerinin çözünürlüğünü, emilimini, stabilitesini, hedef dokularda tutunmayı ve biyoyararlanımı arttırabildiği gösterilmiştir. İlaç dağıtım araştırmalarında yaygın olarak kullanılan biyoyumlu ve biyobozunabilir nanopartiküller arasında lipozomlar, nanoemülsiyonlar, lipid nanotaşıyıcılar, miseller ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküller gibi yapılar bulunabilmektedir. Bu organik nanopartiküllere ilaveten altın, gümüş, çinko, bakır oksit, alüminyum oksit, demir oksit, seramik ve karbon nanopartikülleri gibi inorganik nano yapılar da ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadır (Wang vd., 2014).

Nanoteknoloji; sağlık ve ilaç ürünlerinin ömrünü uzatmak, performanslarını ve etkinliği arttırmak için uygulanabilir (Ochekpe vd., 2009). Nanopartiküller bir ilacı bozunmaya karşı koruyabilmektedir, difüzyonu kolaylaştırarak ilaç emilimini arttırabilmektedir, hücre içi penetrasyon ve dağılımı iyileştirebilmektedir. Ayrıca, nanopartikülün yüzey özellikleri değiştirilerek ilacın istenen salım şekli ve biyodistribüsyonu sağlanabildiği bilinmektedir (Bilia vd., 2014; McClements, 2012; McClements ve Xiao, 2012).

Nanoteknolojinin bir konusu olarak nanoemülsiyonlar (veya mikroemülsiyonlar) ilk olarak, Elworthy ve Attwood tarafından 1970'li yılların ortalarında, suda iyi çözünmeyen ilaçlar için potansiyel araç olarak kullanılması düşüncesiyle incelenmiştir. Bununla birlikte, 1980'lerin ortasından sonuna kadar, ilaç taşıyıcı sistemler olarak geniş çapta araştırılmışlardır (Harwansh vd., 2011).

Son yıllarda, bitkisel aktif maddeler ve ekstraktlarının ilaç dağıtım sistemleri ile formüle edilmesinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bitkisel hammaddelerden hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlere örnek olarak; zerdeçal (*Curcuma* sp.) etken maddelerinden kurkumin lipozomu, zerdeçal uçucu yağı nanoemülsiyonu, çiğdem (*Colchicum* sp.) etken maddelerinden kolşisin lipozomu, *Cuscuta chinensis* nanopartikülü, ginseng (*Panax ginseng*) fitozomu verilebilir (Saraf, 2010). Guliani ve diğerlerinin (2021) çalışmasında, uçucu yağ etken bileşenlerinden citral ve karvon karışımı ile elde edilen nanoemülsiyonlar güçlü antioksidan ve antibakteriyel etki göstermiştir. Uçucu yağ nanoemülsiyonları özellikle gıda sanayinde antimikrobiyal etkinin artırılması ve koruyucu özellikleri nedeniyle araştırılmaktadır. Bir çalışmada, tarçın ve karanfil yağı karışımı ile elde edilen nanoemülsiyon uçucu yağların tek başına gösterdiklerinden daha fazla antimikrobiyal etkili bulunmuştur (Zhang vd., 2017). Bir başka çalışmada, Kekik (*Thymus daenensis* Celak.) uçucu yağı nanoemülsiyonunun ultrasonik nanoemülsiyonlaşma yöntemi kullanılarak elde edilmesi ile domateslerdeki mikrobiyolojik kontaminasyonun engellendiği bildirilmiştir (He vd., 2021). Uçucu yağ nanoemülsiyonları çevreye zarar vermeyen insektisidal etkili doğal ürünler olarak da formüle edilmektedir. Bir çalışmada, anason (*Pimpinella anisum* L.) uçucu yağının insektisidal etkisi nanoemülsiyon elde edilmesi ile artırılmıştır (Hashem vd., 2018).

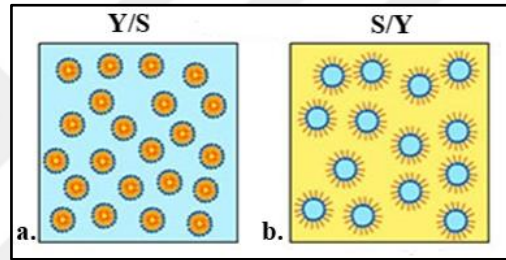
## **1.2. Emülsiyonlar ve Sınıflandırılmaları**

### **1.2.1. Klasik emülsiyonlar**

Emülsiyonlar, bir sıvının diğer bir veya birkaç sıvı içinde birbiriyle karışmadan dağılmış olduğu sistemlerdir. Klasik bir emülsiyon, ortalama yarıçapları 100 nm ile 100 mm arasında olan damlacıkları içermektedir. Bu tür bir koloidal dispersiyon sistemi termodinamik olarak kararsızdır ve zamanla bozunmaktadır. Emülsiyonlardaki fazların ayrılmasının engellenmesi ve daha stabil hale gelmesi uygun bir sürfaktan madde eklenerek gerçekleştirilmektedir. Klasik emülsiyonlar, görünür ışığın dalgaboyundan

büyük ya da aynı boyuttaki damlacıklara sahip olduğundan, ışığın saçılması nedeniyle optik olarak bulanık veya opaktır (Kumar ve Singh, 2012).

Uygulamalarda kullanılan temel olarak iki çeşit emülsiyon vardır. Bunlar; su içinde yağ (Y/S) ve yağ içinde su (S/Y) emülsiyonlarıdır (Şekil 1.1). Y/S ve S/Y emülsiyonlarını aynı anda içeren S/Y/S ve Y/S/Y gibi çoklu emülsiyonlar da vardır. Bu emülsiyonların içerdiği yağ damlacıkları, sürfaktanın tipi ve miktarı, emülsifikasyon yöntemi gibi çeşitli faktörlerden etkilenecek emülsiyon sisteminin stabilitesini ve özelliklerini belirlemektedir. Son yıllarda, Y/S nanoemülsiyonları sağlık, kozmetik, gıda, ziraat, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında geniş ölçüde uygulama alanı bulmuştur (Setya vd., 2014; Chime vd., 2014).



**Şekil 1.1.** Emülsiyon tipleri; **a.** Su içinde yağ (Y/S) emülsiyonu, **b.** Yağ içinde su (S/Y) emülsiyonu (Chime vd., 2014).

### 1.2.2. Nanoemülsiyonlar

Nanoemülsiyonlar, ortalama damlacık çapları 1-100 nm arasında değişen emülsiyonlaştırılmış yağ ve su sistemlerinden oluşan ilaç dağıtım sistemleri olarak tanımlanmaktadır (Chime vd., 2014; Kale ve Deore, 2017). Nanoemülsiyonlar; miniemülsiyonlar, ince dağılık emülsiyonlar ve mikron altı emülsiyonlar olarak da tanımlanırlar (Anton vd., 2008; Bilal vd., 2014). Damlacık boyutu görünür ışık dalga boyunun %25'inden daha az olduğu için nanoemülsiyon şeffaf görünümündedir. Dolayısıyla daha az ışık saçılımı sağlarlar. Nanoemülsifikasyon, lipofilik ilaçların suda çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmak için uygulanan bir yaklaşımdır. Nanoemülsiyonlar, çok küçük boyutlara ve yüksek kinetik stabiliteye sahip olmaları nedeniyle birkaç yıl stabil halde kalabilirler (Bilal vd., 2014).

Bir nanoemülsiyon, küçük damlacıklar içeren klasik bir emülsiyon olarak düşünülebilir. Çok küçük damlacık boyutu yerçekimsel ayırma için klasik emülsiyonlara

kıyasla çok daha iyi stabiliteye sahip oldukları anlamına gelir. Nanoemülsiyonlar damlacıkların birleşmesi ve kremalaşmaya karşı klasik emülsiyonlardan daha stabildir. Bununla birlikte, bu sistemler klasik emülsiyonlar gibi termodinamik açıdan kararsızdır. Termodinamik açıdan kararsız olmasının nedeni, yağ ve su fazlarının ayrı ayrı nanoemülsiyonlardan daha düşük serbest enerjiye sahip olmalarıdır (McClements ve Xiao, 2012; Kumar ve Singh, 2012).

Nanoemülsiyonların klasik emülsiyonlara karşı birçok avantajı vardır (Setya vd., 2014; Chime vd., 2014; Kumar ve Singh, 2012). Bunlar aşağıda listelenmiştir:

- ❖ Yüksek kinetik stabiliteye sahiptirler, bu nedenle yıllarca stabil kalabilirler.
- ❖ Üretim ve ölçeklendirme kolaylığı ile farklı dozaj formlarına formüle edilebilir.
- ❖ Genellikle güvenli tüketime ve kullanıma uygun (GRAS-Generally regarded as safe) sürfaktanlarla formüle edilmektedirler.
- ❖ Toksik olmayan birleşim ve konsantrasyonlarda hazırlanabilirler.
- ❖ Absorpsiyon hızını ve biyoyararlanımı arttırmaktadırlar.
- ❖ Az enerji girişi (ısı veya karıştırma) ile üretilebilir.

Bununla birlikte, nanoemülsiyonların bazı dezavantajları vardır (Setya vd., 2014; Chime vd., 2014; Kumar ve Singh, 2012). Bu dezavantajlar;

- ❖ Yüksek enerjili cihaz ve altyapıların kullanılıp uygulandığı nanoemülsiyon formülasyonları ekonomik olarak maliyetli süreçlerdir.
- ❖ Yüksek erime noktasına sahip maddeler için zayıf çözülebilirlik söz konusudur.
- ❖ Nanoemülsiyon formülasyonlarıyla ilgili temel sorun olan “Ostwald olgunlaşma mekanizması” halihazırda açıklanamamıştır.
- ❖ Nanoemülsiyonların stabilitesi; sıcaklık ve pH değişimlerinden etkilenebilir.

### 1.2.3. Mikroemülsiyonlar

Mikroemülsiyonlar 1-100 nm arasında değişen boyutlarda damlacıklar içeren emülsiyon sistemleridir. Damlacık boyutlarının görünür ışığın dalgaboyundan daha küçük olması nedeniyle optik olarak şeffaftırlar (McClements ve Xiao, 2012; Kale ve Deore, 2017).

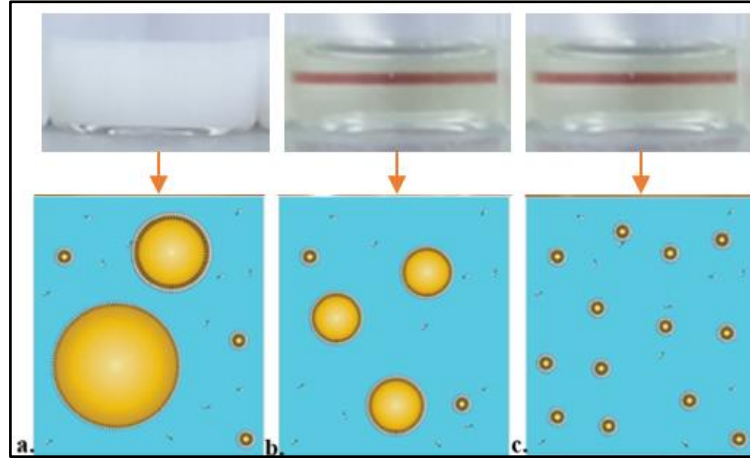
Mikroemülsiyon sistemlerinin serbest enerjisi, ayrılmış yağ ve su fazlarından daha düşüktür. Bu nedenle, termodinamik olarak stabil sistemlerdir. Bir mikroemülsiyon sadece belirli çevresel koşullarda (Örneğin; belirli bileşim, sabit sıcaklık ve basınç altında) termodinamik olarak stabildir. Bu nedenle, çevresel koşullar değiştiğinde mikroemülsiyon stabilitesi değişebilir (McClements ve Xiao, 2012; Setya vd., 2014).

Mikroemülsiyonun hazırlanması kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemleri ile bazı iyonik olmayan sürfaktanları kullanılarak gerçekleştirilebilir (Setya vd., 2014). Mikroemülsiyonların en büyük dezavantajı, farmasötik uygulamalarda kullanıldığında toksikliğe neden olabilecek yüksek sürfaktan madde konsantrasyonuna ihtiyaç duymasıdır. Bunun yanında, nanoemülsiyonlar daha düşük sürfaktan konsantrasyonları kullanılarak hazırlanabilir (Bilia vd., 2014; Setya vd., 2014).

#### **1.2.4. Nanoemülsiyon ve mikroemülsiyon arasındaki farklar**

Mikroemülsiyonlar ile nanoemülsiyonlar arasındaki ayrımı doğru bir şekilde yapmak önemlidir; çünkü bu ayrım, kullanılacak yöntemleri, uzun süreli stabilitelerini ve fonksiyonel performanslarını belirlemektedir (McClements, 2012).

Emülsiyonların sınıflandırılması literatürde açık bir şekilde tanımlanmamıştır. Bir nanoemülsiyonun tanımı, bir mikroemülsiyonunkine çok benzer; ikisi de su içinde yağ veya yağ içinde su dağılımıdır ve damlacık boyutu dağılımı dar bir alandadır (Harwansh vd., 2011). Mikroemülsiyonların aynı zamanda nanoemülsiyon olarak adlandırıldığı çalışmalar da vardır (Saraf, 2010). Emülsiyonlar genellikle boyutlarına ve özelliklerine göre klasik emülsiyonlar, mikroemülsiyonlar ve nanoemülsiyonlar olarak sınıflandırılmalarına (Şekil 1.2) rağmen net bir ayrım söz konusu değildir. Mikro boyut  $10^{-6}$  yani bir fiziksel büyüklüğün milyonda biri ve nano boyut ise  $10^{-9}$  yani bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri anlamına gelir. Ancak, literatürde nanoemülsiyondaki damlacıklar mikroemülsiyondaki damlacıklardan daha büyük olarak tanımlanmaktadır (McClements, 2012). Literatürde mikroemülsiyon ve nanoemülsiyon damlacık boyut aralığı da birbirinden tutarsızdır ve farklı boyut aralıklarında kabul görmektedir (Anton ve Vandamme, 2011; Gupta vd., 2016; Kale ve Deore, 2017).



**Şekil 1.2.** Emülsiyonların sınıflandırılması a. Klasik emülsiyon, b. Nanoemülsiyon, c. Mikroemülsiyon (Piorkowski ve McClements, 2014; Kale ve Deore, 2017).

Bir nanoemülsiyonun fiziksel görünüşü, bir mikroemülsiyonunkine çok benzerdir ancak iki sistem arasında önemli bir fark vardır. Mikroemülsiyon termodinamik olarak stabil iken bir nanoemülsiyon kinetik olarak stabildir (Harwansh vd., 2011). Prensip olarak, bir kolloidal dispersiyonun yapısı ve özellikleri depolama sırasında sabit kalırsa genellikle mikroemülsiyondur ancak yapı ve özellikler değişirse genellikle nanoemülsiyon olduğu söylenmektedir. Pratikte, bir mikroemülsiyonun özellikleri kimyasal bozunma veya mikrobiyal kontaminasyona bağlı olarak değişebilir, ancak bir nanoemülsiyonun özellikleri yüksek bir kinetik stabiliteye sahip olduğu için uzun süreler boyunca değişmeyebilir (McClements, 2012).

Nanoemülsiyon ve mikroemülsiyonlar hazırlandıktan sonra, sıcaklığın değiştirilmesi ve seyreltmenin dinamik ışık saçılımına etkisinin incelenmesi yoluyla birbirinden ayrılabilir. Ancak, sıcaklık değişikliği, mikroemülsiyonun boyutunu ve yapısını önemli ölçüde etkilerken sıcaklık değişikliğinin nanoemülsiyonlarda damlacıkların boyutu üzerinde ani bir etkisi yoktur. Bunun yanında, sistemin seyreltilmesi, mikroemülsiyonlarda damlacık boyutunda değişime neden olurken, nanoemülsiyonlardaki damlacık büyüklüğünde hiçbir değişiklik meydana getirmediği bildirilmiştir (Anton ve Vandamme, 2011; Setya vd., 2014).

Mikroemülsiyonlar ve nanoemülsiyonların genel özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 1.1’de verilmiştir.

**Tablo 1.1.** Mikroemülsiyon ve nanoemülsiyonların karşılaştırılmaları (Setya vd., 2014; Bilal vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012).

| <b>Mikroemülsiyon</b>                                             | <b>Nanoemülsiyon</b>                                                       |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Şeffaf görünümündedirler.                                         | Şeffaf veya yarı şeffaf mavimsi renktedirler.                              |
| Düşük enerjili yöntemlerle hazırlanırlar.                         | Düşük ve yüksek enerjili yöntemlerle hazırlanabilirler.                    |
| Kullanılan sürfaktan konsantrasyonu yüksektir (yaklaşık %20 a/h). | Kullanılan sürfaktan konsantrasyonu nispeten daha düşüktür (%3-10 a/h).    |
| Termodinamik olarak stabildir.                                    | Termodinamik olarak stabil değildir. Kinetik olarak stabildir.             |
| Küresel veya küresel olmayan damlacıklar içerirler.               | Küresel damlacıklar içerirler.                                             |
| Damlacık boyut dağılımında tek dar bir pik verirler.              | Damlacık boyut dağılımında tek veya çoklu, dar veya geniş pikler verirler. |

Mikroemülsiyonlar, damlacık boyutu dağılımlarında tek bir dar tepe noktasına sahip olma eğilimindeyken nanoemülsiyonlar, dar veya geniş olabilen tek veya çoklu tepe noktalarına sahip olabilmektedir. Bu nedenle, bir kolloidal dispersiyon tek bir dar tepe içeriyorsa, o zaman bir mikroemülsiyon veya nanoemülsiyon olabilir, fakat eğer birden fazla pik veya geniş tepeler içeriyorsa, o zaman muhtemelen bir nanoemülsiyondur (McClements, 2012).

Nanoemülsiyonlar, üzerlerine etkiyen büyük Laplace basıncı nedeniyle küresel damlacıklar içerme eğilimindedir, oysa mikroemülsiyonlar, ultra-ince arayüzey gerilimi nedeniyle küresel veya küresel olmayan damlacıklar oluşturabilir. Dolayısıyla, bir nanoemülsiyonun damlacıkların şekli mikroskopi yöntemleri kullanılarak belirlenebilir. Bir sistem küresel damlacıklar içeriyorsa, bu mikroemülsiyon veya nanoemülsiyon olabilir (McClements, 2012).

### 1.3. Nanoemülsiyonların Formülasyonu

Emülsiyonların formüle edilmesi genel olarak etken madde, yağ, sürfaktan/kosürfaktanlar, sulu faz ve yardımcı maddeler ile gerçekleşmektedir (Setya vd., 2014). Nanoemülsiyon hazırlanmasında kullanılan tüm yardımcı maddelerin, GRAS kategorisine giren şartlara bağlı olarak oral veya topikal uygulama için farmasötik olarak kabul edilebilir olması gerekir (Chime vd., 2014). Bu şekilde elde edilen

nanoemülsiyonlar; kremler, jeller, köpükler, spreyley vb. farmasötiklerin verilmesi için etkin ve güvenlidir (Chime vd., 2014; Bonferoni vd., 2019).

Süpfaktan maddeler, nanoemülsiyon hazırlamak için temel bir gereksinim olan yağ/su arayüzünde ultra düşük ara yüzey gerilimi elde edebilmelidir ve sürekli fazda çözünabilir olmalıdır. Süpfaktan konsantrasyonu, stabil nano damlacıkları elde etmek için gerekli süpfaktan moleküllerinin sayısını sağlayacak kadar yüksek olmalıdır (Kumar ve Singh, 2012; Setya vd., 2014; Chime vd., 2014).

Nanoemülsiyon eldesinde yağ seçimi, ilacın yağ fazındaki çözünürlüğü için önemli bir kriterdir. Düşük ilaç çözünürlüğüne sahip yağ ile nanoemülsiyonun formülasyonu, hedef ilaç dozunu eklemek için daha fazla yağın bir araya getirilmesini gerektirmektedir; bu da yağ çözünürlüğünü sağlamak için sistemin toksikliğini artırabilecek daha yüksek süpfaktan madde konsantrasyonu gerektirmektedir. S/Y nanoemülsiyonları, hidrofilik ilaçlar için daha iyi bir seçim iken, lipofilik ilaçlar Y/S nanoemülsiyonlarında daha iyi çözünür hale getirilmektedir (Chime vd., 2014). Nanoemülsiyonların formülasyonunda genellikle doğal, yarı-sentetik ve sentetik çeşitli yağlar kullanılmaktadır. Genel olarak farklı doymuşluk derecesine sahip uzun ve orta zincirli trigliserid içeren yağlar, serbest yağ asitleri, uçucu yağlar, mineral yağlar ve yağda çözünen vitaminler yağ fazı olarak kullanılmaktadır (McClements ve Rao, 2011; Kale ve Deore, 2017).

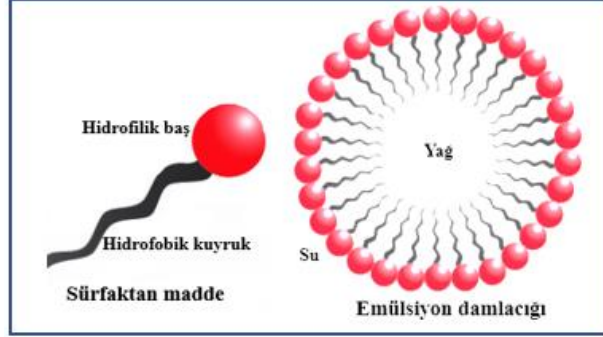
### **1.3.1. Nanoemülsiyon eldesinde kullanılan süpfaktan maddeler**

Süpfaktanlar, yüzey aktif madde olarak bilinen emülsifiye edici maddelerdir. Süpfaktan maddeler, birbirleriyle karışmayan iki sıvı arasındaki ara yüzey gerilimini düşürerek nanoemülsiyon formülasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunurlar ve bunları karışabilir hale getirirler (Setya vd., 2014; Tadros vd., 2004).

Süpfaktanlar genellikle; küçük moleküllü süpfaktanlar, protein ve polisakkarit yapıdaki süpfaktanlar olarak sınıflandırılırlar. Mikroemülsiyonların sadece küçük moleküllü süpfaktanlarla hazırlanabileceği bildirilmiştir. Protein ve polisakkarit yapıdaki süpfaktanlar ile nanoemülsiyonlar ve klasik emülsiyonlar elde edilebilir (McClements, 2012; Wang, 2014).

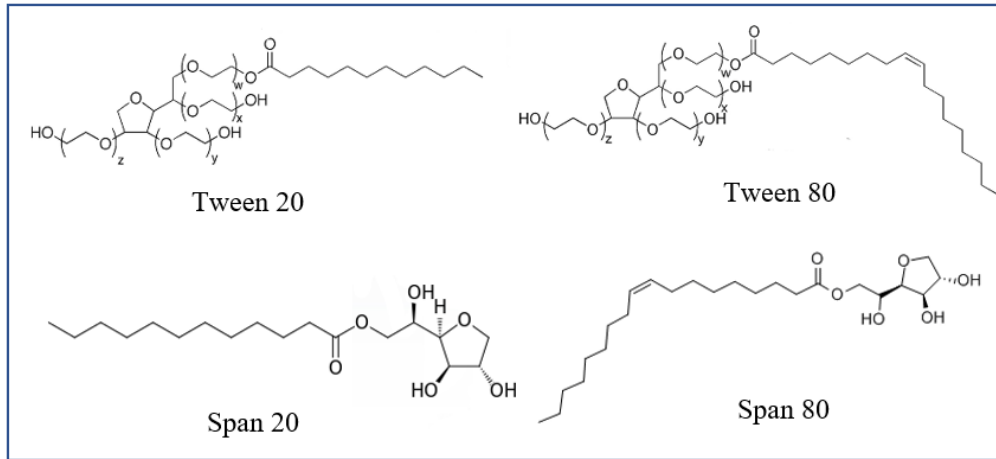
Küçük moleküllü süpfaktanlar amfifilik özelliktedirler; hidrofilik ve hidrofobik grupları taşırlar. Hidrofilik (Polar) baş ve hidrofobik (Apolar) kuyruğu içeren küçük moleküllü süpfaktanlar Şekil 1.3'te şematize edilmiştir. Bu süpfaktanlarda lipofilik

kuyruğun uzunluğunun artmasıyla; sürfaktanın çözünürlüğü organik çözücülerde artarken sudaki çözünürlüğü düşmektedir (Lawrence ve Rees, 2000).



**Şekil 1.3.** Küçük molekül süpfaktan maddenin yapısı ve bu süpfaktanların oluşturduğu emülsiyon damlacığı (Lawrence ve Rees, 2000).

Süpfaktan molekülleri polar ve polar olmayan iki kısımdan oluşur ve elektrik yüklerine göre; anyonik, katyonik, iyonik olmayan ve zwitteriyonik süpfaktanlar olarak sınıflandırılır. İyonik olmayan süpfaktanlar, sulu çözeltide herhangi bir elektrik yükü taşımazlar ve çözeltilerdeki diğer yüklü bileşikler ile çok düşük etkileşim gösterirler. Bu nedenle, iyonik olmayan süpfaktanlarla hazırlanan emülsiyonlar pH ve iyonik güçlere karşı daha az duyarlıdır, biyolojik olarak uyumludur ve güvenli kabul edilirler. Toksikolojik kaygılar nedeniyle iyonik süpfaktanlara kıyasla daha fazla tercih edilirler (Chime vd., 2014). Ancak, bu süpfaktanlar, sıcaklık değişimlerine karşı duyarlıdır. Sıcaklık arttıkça sulu çözeltideki iyonik olmayan süpfaktanların çözünürlüğü azalır (Lawrence ve Rees 2000). İyonik olmayan süpfaktanlardan sorbitan esterleri (Sorbitoller; Tween® ve Span® gibi) düşük toksisiteleri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Sorbitoller, glikozun hidrojenasyonu ile elde edilirler. Ticari olarak Span® ismiyle bilinen sorbitan esterleri lipofilik süpfaktanlardır. Tween® ticari ismiyle bilinen etoksillenmiş sorbitan esterleri hidrofilik özelliktedirler. Etoksillenmiş sorbitan esterleri, sorbitan yağ asidi esterinin etilen oksit ile tepkimeye girmesiyle elde edilirler (Takamura vd., 1979; Wang, 2014). Şekil 1.4'te Span® ve Tween® yapıları gösterilmektedir.



**Şekil 1.4.** İyonik olmayan sürfaktanlardan Tween 20, Tween 80, Span 20 ve Span 80'nin kimyasal yapısı (Takamura vd., 1979; Wang, 2014).

Anyonik ve katyonik sürfaktanlar, pH ve ortamdaki elektrolit konsantrasyonundan etkilenirler ancak sıcaklık değişimlerinden çok az etkilenirler veya hiç etkilenmezler (Lawrence ve Rees 2000). Zwitteriyonik sürfaktanlar, aynı molekül üzerinde zıt yüklere sahip iki ya da daha fazla iyonize olabilen gruplar içerirler ve içinde bulundukları çözeltinin pH değerine göre özellikleri değişmektedir. Fosfolipitler, zwitteriyonik sürfaktanların önemli bir örneğidir ve genellikle çok iyi biyoyumluluk gösterirler (Kumar ve Singh, 2012).

Sürfaktan molekülünün hidrofilik ve hidrofobik kısımları “hidrofil-lipofil denge (HLB)” olarak bilinir. Uygun HLB değerine sahip sürfaktanın seçilmesi önemlidir. Düşük HLB değerinde hidrofobik kısım ve yüksek HLB değerinde hidrofilik kısım baskındır (Chime vd., 2014). Düşük HLB'ye sahip sürfaktanlar (3-6), genellikle S/Y nanoemülsiyonlarını oluştururken, yüksek HLB'ye (8-18) sahip sürfaktanlar Y/S nanoemülsiyonlarını oluşturabilir. Tween 20 ve Tween 80'nin HLB değerleri sırasıyla 16,7 ve 15'tir. Span 20 ve Span 80'nin HLB değerleri ise sırasıyla 8,6 ve 4,3'tür (Setya vd., 2014).

Hidrofilik ve lipofilik sürfaktan madde karışımlarının çeşitli uygulamalar için çoğu zaman daha verimli oldukları bildirilmiştir. Sistemin HLB'si sürfaktanların ve kosürfaktan/kosolventlerin doğru bir şekilde seçilmesi ile değiştirilebilir (Setya vd., 2014). Sürfaktan karışımları, damlacık boyutunu nispeten azaltabilir ve ara yüzey tabakasının sağlamlığını artırabilir. Bazı spesifik sürfaktan karışımları, iki ayrı bileşenden daha düşük yüzey gerilimi değerleri verir (Setya vd., 2014; Peng vd., 2010; Vilasau vd.,

2011; Fu vd., 2010; Chime vd., 2014). Bir çalışmada Tween 40 ve Span 20 karışımı kullanılarak optimum mineral yağı emülsiyonları üretilebilmiştir (Gullapalli ve Sheth, 1999). Limon yağı nanoemülsiyonlarının asitlik stabilitesi, sükroz monopalmimat ve Tween 80'in karıştırılmasıyla geliştirilmiştir (Rao ve McClements, 2012-1). Bir başka çalışmada, Tween 80 ve Span 80'in kombinasyonu, nanoemülsiyonları stabilize etmek için sinerjik etki göstermiştir (Fu vd., 2010).

#### **1.4. Nanoemülsiyonların Elde Edilme Yöntemleri**

Nanoemülsiyonlar dengelenmemiş sistemlerdir ve bu yüzden bunların hazırlanması, büyük miktarda enerji veya sürfaktan madde girişi ve bazı durumlarda her ikisinin kombinasyonunu gerektirir. Nanoemülsiyon formülasyonlarında, yüksek enerji veya düşük enerjili yöntemler kullanılabilir (Chime vd., 2014).

Nanoemülsiyon formülasyonunda; yüksek enerjili yaklaşımlar, küçük yağ damlacıkları elde etmek için yoğun yıkıcı kuvvetleri üretebilen; ultrasonikatörler, mikroakışkanlaştırıcı ve yüksek basınçlı homojenleştiriciler vb. mekanik cihazları kullanmaktadır (Kumar ve Singh, 2012; Ghosh vd., 2013-2). Düşük enerji yöntemlerinde ise dış kuvvet sağlanmaz; bunun yerine sistemin gerçek fizyolojik özelliklerinden yararlanır. Düşük enerji yöntemleriyle hazırlanan nanoemülsiyonlar, sistemin depolanmış enerjisine dayalıdır ve sıcaklık, karıştırma, sürfaktan tipi ve miktarı gibi parametrelerin değiştirilmesi ile üretilmektedir (Chime vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012; Setya vd., 2014). Mikroemülsiyonlar ise sadece düşük enerjili yöntemler olan; kendiliğinden emülsifikasyon ve faz dönüşümü sıcaklığı yöntemleriyle elde edilebilirler (Kale ve Deore, 2017).

##### **1.4.1. Yüksek enerjili emülsifikasyon yöntemleri**

###### **1.4.1.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon**

Yüksek basınçlı homojenizasyon, nanoemülsiyonların üretimi için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Yüksek basınçlı homojenleştirme sırasında kaba makroemülsiyon, 500-5000 PSI arasındaki bir çalışma basıncında küçük bir delikten geçirilir. Bu işlem sırasında, hidrolik kesme, yoğun türbülans ve kavitasyon gibi birkaç kuvvet birlikte hareket ederek küçük damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonlar üretir. Emülsiyon formülasyonu, istenen damlacık boyutunda nanoemülsiyon elde edilinceye

kadar tekrar yüksek basınçlı homojenizasyona tabi tutulabilir (Setya vd., 2014).

Yüksek basınçlı homojenizasyon laboratuvarında ve endüstriyel ölçekte etkili bir yöntemdir, ancak büyük miktarda enerji tüketir ve işlem sırasında sıcaklık artar (Setya vd., 2014).

#### **1.4.1.2. Mikroakışkanlaştırma**

Mikroakışkanlaştırma yönteminde, 20.000 PSI'ye kadar olan çok yüksek basınçlarda çalışan yer değiştirme pompası kullanılır. Bu pompa, makroemülsiyon damlacıklarını, bir dizi mikro kanaldan oluşan etkileşim bölgesinden geçirir. Mikrokanallardan geçen makroemülsiyon, çarpışma alanında yüksek hızla çarpışır ve nanoemülsiyonlar oluşur (Maali ve Mosavian, 2013; Kumar ve Singh, 2012; Setya vd., 2014).

#### **1.4.1.3. Ultrasonikasyon**

Ultrasonik homojenizatörler; elektrik dalgalarını yoğun basınç dalgalarına dönüştürmekte ve şiddetli yıkıcı kuvvetler oluşturmaktadır. Ancak bu yöntem, küçük miktarlar için daha uygundur ve daha çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Kumar ve Singh, 2012; McClements, 2011; Kentish vd., 2008). Ultrasonik enerji girdisini ve zamanını değiştirerek istenen özelliklere sahip nanoemülsiyonlar elde edilmektedir (Solans vd., 2005).

#### **1.4.2. Düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleri**

Düşük enerjili emülsiyonlaşma yöntemleri, nano damla oluşturmak için sistemin depolanan enerjisini kullanmaktadır. Düşük enerji yaklaşımları, yüksek enerjili yaklaşımlara kıyasla küçük damlacıklar üretmekte genellikle daha etkilidir; ancak bu emülsiyonlaşma yöntemlerinde kullanılabilecek yağ ve sürfaktan tipleri daha sınırlıdır. Günümüzde nanoemülsiyon oluşturmak için kullanılan düşük enerjili yaklaşımların çoğunda sürfaktan olarak proteinler veya polisakkaritler kullanmak mümkün değildir. Bunun yerine, nispeten yüksek konsantrasyonlarda sentetik sürfaktan maddelerin kullanılması gerekmektedir. Düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleri genellikle “kendiliğinden emülsifikasyon” ve “faz dönüşümü sıcaklığı” yöntemlerini içermektedir (Chime vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012; Anton vd., 2008).

#### **1.4.2.1. Faz dönüşümü sıcaklığı (Phase Inversion Temperature-PIT) yöntemi**

Faz dönüşüm sıcaklığı (PIT) yöntemi ile nanoemülsiyon eldesi; sabit emülsiyon bileşiminde, sıcaklıkta değişiklik yapılarak gerçekleştirilmektedir ve emülsiyonlaşma yöntemi sürecinde oluşan faz geçişleri ile kimyasal enerji elde edilmektedir. Bu yöntemde; makroemülsiyon karışımı yavaş yavaş ısıtıldığında, polietoksilenmiş sürfaktan madde dehidrasyona bağlı olarak lipofilik hale gelir ve daha yüksek sıcaklıklarda sürfaktan madde, yağlı fazda tamamen çözünür hale gelir. Sonuçta, başlangıçtaki Y/S emülsiyonu S/Y emülsiyonuna çevrilir (Chime vd., 2014). Sıcaklığın hızlı bir şekilde değişmesi birleşmeyi engeller ve stabil nanoemülsiyonlar üretilir (Kumar ve Singh, 2012; Setya vd., 2014; Anton vd., 2008).

#### **1.4.2.2. Kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi (Su titrasyonu yöntemi)**

Kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi ile herhangi bir organik çözücü ve ısı kullanmadan nanoemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar elde edilebilmektedir (Rao ve McClements 2012-2). Karıştırma altında yağ/sürfaktan karışımına kademeli olarak su ilavesi ile küçük damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyon ve mikroemülsiyonların üretilebileceği gösterilmiştir (Forgiarini vd., 2001). Emülsiyonlaşma işleminin kendiliğinden olması genellikle ara yüzey gerilimi, viskozite, sürfaktan yapısı ve konsantrasyonuna bağlıdır (Setya vd., 2014). Bu yöntemin dezavantajı, sadece iyonik olmayan küçük moleküllü sürfaktanların ve düşük viskoziteli yağların kullanılmasıdır. Sisteme eklenen yağ konsantrasyonu da oldukça düşük olmalıdır ve yüksek sürfaktan/yağ oranı gereklidir (McClements, 2011; Rao ve McClements 2012-2).

Kendiliğinden emülsiyonlaşma sistemlerinin, koenzim Q10, halofantrin, vitamin E ve siklosporin-A gibi hidrofobik ilaçların verilmesinde ve hedeflenmesinde kullanıldığı bildirilmiştir (Chime vd., 2014). Bir çalışmada, *Curcuma zedoari* Rosc. (beyaz zerdeçal)'ın köklerinden elde edilen uçucu yağ, oral kullanım için kendiliğinden nanoemulsifikasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Bu çalışmada uçucu yağ, etil oleat, tween 80, transcutool P (30,8:7,7:40,5:21; a:a:a:a) içeren formülasyon hazırlanmıştır. Formülasyon su ile karıştırıldıktan sonra, ortalama  $68.3 \pm 1.6$  nm ve zeta potansiyeli  $-41.2 \pm 1.3$  mV olan damlacıklara dönüşmüştür. Sonuç olarak formüle edilen aktif bileşenler, 25°C'de en az 12 ay depolamada stabil kalmıştır (Zhao vd., 2010).

### **1.5. Emülsiyonların Stabilitesi**

Nanoemülsiyonların stabilitesi, sürfaktan ve kosürfaktanın türü ve konsantrasyonu, yağ fazı türü, kullanılan yöntemler, fazların birbirlerine karşı çözünürlüğü, proses değişkenleri ve katkı maddelerinin eklenmesi gibi faktörler kontrol edilerek arttırılabilir (Kumar ve Singh, 2012; Chime vd., 2014; Anton vd., 2008; Setya vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012). Çeşitli destabilizasyon mekanizmaları vardır: Bunlar Şekil 1.5'te; faz ayrımı, flokülasyon, koalesens, kremalaşma ve Ostwald olgunlaşması olarak verilmiştir (Robins 2000).

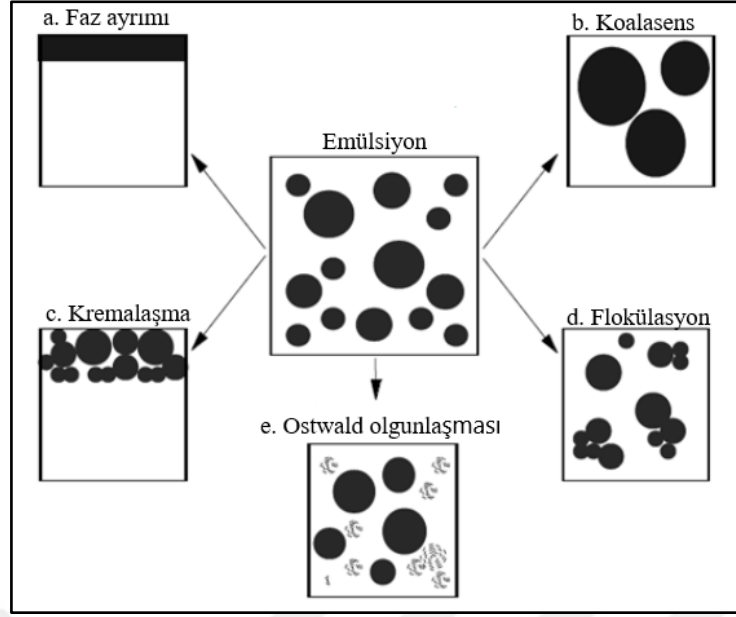
#### **1.5.1. Kremalaşma ve sedimentasyon**

Kremalaşma, sürekli fazdan daha düşük yoğunluğa sahip damlacıkların yukarı doğru hareket etmesidir (Şekil 1.5). Sedimentasyon ise sürekli fazdan daha yüksek yoğunluğa sahip damlacıkların aşağıya doğru hareket etmesidir. Uçucu ve sabit yağların çoğu sudan daha hafiftir. Bu nedenle, Y/S emülsiyonlarındaki damlacıklar genellikle kremalaşma eğilimindedirler. Yağ içindeki su emülsiyonlarında ise bu yağlar aşağıda birikme eğilimindedirler (Robins 2000; Tadros vd., 2004).

Fazlar arasında yoğunluk farkını en aza indirmek ve damlacık boyutunu azaltmak yoluyla kremalaşma ve sedimentasyon engellenebilir. Suyun yoğunluğundan daha düşük yağlar kullanıldığında yoğunluk eşleşmesi için; yağ fazına genellikle ester zambkı ve sakkaroz asetat izobütirat gibi yağda çözünebilir ve ağırlık veren maddeler ilave edilmektedir (Wang, 2014). Yoğun damlacık konsantrasyonu içeren emülsiyonlarda, damlacıkların hareketini engelleyen üç boyutlu ağ yapısı nedeniyle kremalaşma hızı gecikmektedir ve viskozite artışı ile birlikte çoğu zaman jel oluşmaktadır (Demetriades vd., 1997).

#### **1.5.2. Flokülasyon (Topaklanma)**

Flokülasyon, iki veya daha fazla yağ damlacığının bireysel bütünlüklerini koruyarak bir araya gelerek büyük kümeleşmiş emülsiyonlar oluşturmalarıdır (Şekil 1.5) (Demetriades vd., 1997). Flokülasyon, damlacıklar ve sürekli faz arasındaki yoğunluk farkının azaltılması veya sürekli fazın viskozitesinin arttırılmasıyla kontrol edilebilir. Noniyonik sürfaktanları kullanarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda çekici kuvvetler oluşmadığından flokülasyon meydana gelmez (Tadros vd., 2004; Setya vd., 2014).



**Şekil 1.5.** Emülsiyonlarda destabilizasyon çeşitleri; a) Faz ayrımı, b) Koalesens, c) Kremalaşma, d) Flokülasyon, e) Ostwald olgunlaşması (Robins, 2000).

### 1.5.3. Koalesans (Birleşme)

Koalesans, yağ damlacıklarının tek bir büyük damlacık oluşturmak üzere bir araya gelmesidir (Şekil 1.5). Y/S emülsiyonlarında koalesans sonucunda faz ayrımı gerçekleşmektedir ve üst kısımda yağ tabakası birikmektedir. Koalesans meydana gelmesi genellikle sürfaktan maddenin tipine ve çevresel faktörlere bağlıdır. Dolayısıyla sürfaktan tipi, pH, iyonik kuvvetler ve sıcaklık değiştirilerek veya iki damlacık arasında iticilere neden olan aynı yüklere sahip sürfaktan madde ilavesiyle koalesans önlenabilir (Tadros vd., 2004; Setya vd., 2014).

### 1.5.4. Ostwald olgunlaşması

Ostwald olgunlaşması; Şekil 1.5'te belirtildiği gibi küçük ve büyük damlacıklar arasındaki çözünürlük farkından kaynaklanmaktadır (Tadros vd., 2004; Setya vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012). Yüksek alkanlar, yüksek molekül ağırlıklı yağlar ve silikon yağları gibi suda çözünür yağların daha az kullanılması ve yağ fazına suda çözünmeyen lipidlerin eklenmesiyle Ostwald olgunlaşması uzun süre önlenabilir. Uzun zincirli trigliserid yağlarının ilavesi ile suda çözünürlüğün azaltıldığı ve böylece Ostwald olgunlaşmasına kinetik bir bariyer sağlandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Setya vd., 2014).

Triaçilgliseroller ile hazırlanan emülsiyonlar, uçucu yağlar ile hazırlananlardan fiziksel olarak daha stabildir. Nispeten yüksek polarite ve düşük viskoziteye sahip uçucu yağ içeren emülsiyon damlacıklarının Ostwald olgunlaşması etkisiyle daha hızlı birleştiği bildirilmiştir (Flanagan ve Singh 2006; Wang, 2014).

#### **1.5.5. Faz dönüşümü**

Faz dönüşümü, emülsiyon sisteminin Y/S emülsiyonundan S/Y emülsiyonuna ya da tam tersine dönüşmesidir. Bu durum, koalesens ve flokülasyon süreçlerini de içermektedir. Küçük moleküllü sürfaktanlar ile hazırlanan emülsiyonlarda; sürfaktanların yapısı, HLB değeri, sıcaklık ve iyonik kuvvetler değiştiğinde faz dönüşümü oluşmaktadır ve genellikle tersinirdir. Faz dönüşümleri, genellikle sıcaklık yükseldiğinde veya düştüğünde meydana gelir. Y/S emülsiyonu soğutulduğunda; kullanılan yağ kısmen kristallenmekte ve ara yüzeyin zarar görmesi sonucu faz dönüşümü oluşmaktadır (Wang, 2014).

#### **1.6. Nanoemülsiyonların Karakterizasyonu**

Nanoemülsiyonların karakterizasyonu; içeriğin homojenliğini, görünüşünü, pH'sını, viskozitesini, yoğunluğunu, iletkenliğini, yüzey gerilimini, boyut dağılımını ve zeta potansiyel değerlerini içeren fiziksel ve kimyasal testleri içermektedir (Morales vd., 2003; Kumar ve Singh, 2012). Nanoemülsiyonların karakterizasyonunda kullanılan parametrelerden bazıları bölüm 1.6.1.-1.6.4.'te açıklanmıştır.

##### **1.6.1. Damlacık boyutu ve boyut dağılımı**

Emülsiyon içindeki damlacıklar farklı boyutlara, dağılımlara ve şekillere sahiptirler. Emülsiyonun içerdiği yağ damlacıklarının boyutları; hazırlama koşulları ve sistem bileşimlerinin değiştirilmesi ile kontrol edilebilir (McClements ve Xiao, 2012). Damlacık boyutunun azalmasıyla, emülsiyonların görünür viskozitesi artmaktadır ve genellikle daha stabil hale gelmektedirler. Duyusal analizler, tatlılık ve acılığın farklı yağ damlacık boyutlarına sahip Y/S emülsiyonları arasında farklı olduğu gösterilmiştir (Dapčević Hadnađev vd., 2013).

Yüksek enerjili yöntemlerde damlacık boyutu; genellikle giren enerjinin yoğunluğuna ve süresine, sürfaktan tipi ve konsantrasyonuna, yağ-su ara yüzey gerilimine

ve fazların viskozitesine bağılı olarak değışmektedir. Düşük enerjili yöntemlerde ise damlacık boyutu değışimi; sürfaktan madde-yağ-su oranı, sürfaktan türü ve iyonik kuvvet gibi sistem bileşimlerine ve sıcaklık, zaman ve karıştırma hızları gibi çevresel koşullara bağılıdır (McClements ve Xiao, 2012). Yapılan çalışmalarda, yağ fazı konsantrasyonundaki artış ile genellikle Y/S emülsiyonlarının damlacık büyüklüğünde artma olduğı bildirilmiştir. Bunun başlıca nedenleri, yağ damlacıklarını kaplamak için gerekli olan sürfaktan konsantrasyonunun yetersiz olması ve koalesansın artmasıdır (Dapčević Hadnađev vd., 2013).

Işık, emülsiyondaki damlacıklar tarafından saçılır ve bu ışık saçılımının derecesi, damlacıkların boyutuna bağılıdır. Teoride, damlacık büyüklüğü ışığın dalga boyundan daha büyük olduğunda, ışık yansıma ve kırılma yoluyla tüm yönlerde saçılır, emülsiyon beyaz renkte görünür ve opaktır. Damlacıkların boyutu ışığın dalga boyundan daha küçük olduğunda ise gelen ışık zayıf bir şekilde saçılır ve emülsiyon yarı şeffaf veya şeffaf olarak görünür. Buna göre, emülsiyonların optik özellikleri ve görsel görünüşleri, şeffaflık, yarı şeffaflık ve opaklık açısından, emülsiyonların türbiditesini ölçerek; nanoemülsiyon, mikroemülsiyon veya klasik emülsiyon olup olmadıklarını belirlemek için kullanılabilir (McClements ve Dungan, 1993; Prince, 1977).

Emülsiyonların ortalama damlacık boyutu ve damlacık boyut dağılımı; ışık saçılımı ve mikroskopik yöntemler ile belirlenebilir. Bunun için, mikroskopi yöntemleri olarak genellikle optik mikroskop, konfokal lazer mikroskopu ve elektron mikroskopu kullanılmaktadır. Genel olarak, 3 µm'den büyük damlacıklar için ışık mikroskopu kolay uygulanabilir bir yöntemdir (Flint 1994; Wang, 2014). Nanoemülsiyonların morfolojisi, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenebilir. SEM, damlacıkların üç boyutlu görüntüsünü verirken TEM ile daha yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmektedir (Chime vd., 2014).

Damlacıkların boyutunu ölçmek için en yaygın kullanılan ışık saçılım teknikleri, “statik ışık saçılımı (SLS)” ve “dinamik ışık saçılımı (DLS)” dır. SLS tekniğı ile ölçülen partikül boyutu aralığı 0,1 - 1000 µm arasındadır, DLS ise 3 - 5000 nm arasında çok daha küçük parçacık aralığını ölçmektedir (McClements ve Dungan, 1993). Nano- ve mikroemülsiyonlar gibi, 100 nm'den küçük damlacık içeren emülsiyonların damlacık boyutu, DLS tekniğı ile analiz edilmelidir. Kümülatörler ortalaması olarak da bilinen Z-ortalaması, DLS'deki birincil ve en stabil parametredir ve bu ortalama, ISO 22412 (Malvern, 2011) tarafından “harmonik şiddette ortalama partikül çapı” olarak

tanımlanmaktadır (Wang, 2014). Polidispersite indeksi (PDI) dağılımın kalitesini veya homojenliğini göstermektedir. Literatüre göre, ölçüm sonuçlarının spektrumlarında nanoemülsiyonların damlacık boyut dağılımı genellikle tek ya da çoklu, dar ya da geniş piklerdir. Mikroemülsiyonlar ise tek ve dar piklere sahiptirler (McClements, 2012).

### **1.6.2. Viskozite**

Nanoemülsiyonların viskozitesi; sürfaktan, su ve yağ bileşenlerinin ve bunların konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak değişmektedir ve stabiliteyi etkilemektedir. Genel olarak su içeriğinin artırılması viskoziteyi düşürürken, sürfaktan ve kosürfaktan miktarının azaltılması, su ve yağ arasındaki ara yüzey gerilimini arttırarak viskozitenin artmasına neden olur (Keservani ve Sharma, 2018; Chime vd., 2014; Mason vd. 2006; Tadros vd. 2004).

### **1.6.3. Elektriksel özellikler (Zeta potansiyeli)**

Emülsiyonlardaki damlacıklar, fonksiyonel performanslarında ve stabilitelerinde önemli bir rol oynayan elektriksel bir yüke sahiptir ve bu yük "zeta potansiyeli" olarak ifade edilir. Zeta potansiyel değerleri, Zetasizer kullanılarak belirlenebilir. Emülsiyon damlacıklarının elektriksel özellikleri, sürfaktan tiplerinin seçimine ve pH, iyonik kuvvet ve yüzey aktif iyonik türler vb. sistem bileşimine bağlı olarak kontrol edilebilir (McClements ve Xiao, 2012; McClements, 2010). Literatürde, Zeta potansiyelinin, damlacıkların stabilitesini anlamak ve tahmin etmek için kullanılabilir olduğu bildirilmiştir. Buna göre, emülsiyon damlacıklarının, elektrostatik itme sonucunda gerçekleşen damlacık agregasyonuna karşı stabil kalması için, zeta potansiyel değerlerinin genellikle en az  $\pm 30$  mV olması beklenmektedir (Kale ve Deore, 2017; Wang, 2014).

Nanoemülsiyonların zeta potansiyel değeri, serbest yağ asitlerinin varlığı nedeniyle genellikle negatiftir. Bunun yanında, oleilamin gibi katyonik bir lipitin katılması ile katyonik nanoemülsiyonlar oluşturulabilir (Chime vd., 2014). Damlacık yükü, farklı elektriksel özelliklere sahip biyopolimerleri kullanarak da değiştirilebilir. Örnek olarak, proteinler (peynir altı suyu proteini, kazein, soya proteinleri ve yumurta proteinleri vb.) tarafından stabilize edilen yağ damlacıkları, proteininin izoelektrik noktasına (pI) göre bir yüke sahiptir (McClements ve Xiao, 2012).

#### **1.6.4. Bulanıklık (Türbidite)**

Emülsiyon sistemlerinin bulanıklığı (türbiditesi), yağ damlacıklarının boyutuna ve konsantrasyonuna bağlıdır. Emülsiyon bulanıklıklarının ölçümleri, ultraviyole ve görünür spektrofotometreler kullanılarak gerçekleştirilir (McClements ve Dungan, 1993).

Chantrapornchai ve diğerlerinin (1998) yapmış oldukları çalışmada, damlacık özelliklerinin emülsiyon görünümü üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. İlgili çalışmada, damlacık büyüklüğü arttıkça, damlacıkların saçılma verimliliği azalmıştır ve emülsiyon renginin arttığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, damlacık konsantrasyonu arttıkça, emülsiyon renginde bir azalma olmuştur. Bu çalışmada, aynı damlacık konsantrasyonuna sahip fakat farklı damlacık boyutlarındaki emülsiyonların, farklı türbidite spektrumlarına sahip olduğu tespit edilmiştir.

#### **1.7. Nanoemülsiyonların Potansiyel Toksisitesi**

Genel olarak, nano ölçekli ürünlerin ve özellikle nanoemülsiyonların güvenliğini belirlemenin basit bir yolu yoktur. Nanoemülsiyonların güvenliğini ve toksisitesini değerlendirmek için çok az araştırma yapılmıştır. Nanoemülsiyonların potansiyel toksisitesi hakkındaki bilgilerin çoğu, diğer nano ölçekli materyaller üzerindeki çalışmalardan gelmektedir. Literatüre göre, biyolojik sistemlerde nanoemülsiyonların güvenliği ve toksisitesi ile ilgili uygulamalar güvenlidir. Nanoemülsiyonların çok yüksek dozlarda toksik olduğu gösterilen az sayıda çalışma vardır. Bu nedenle, genellikle nanoemülsiyonların düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında güvenli olduğu varsayılmaktadır (Wani vd., 2018). Bildiğimiz kadarıyla, nanoemülsiyonların potansiyel toksisitesini değerlendirmek için özel olarak tasarlanmış standart bir test protokolü bulunmamaktadır (McClements ve Rao, 2011).

Karbon nanotüp, gümüş, silika, titanyum dioksit ve çinko oksit vb. nanomalzemeler makro ölçekte bulunmayan özellikler sergiler ve bu durum, öngörülemeyen güvenlik problemleri ve riskler ile sonuçlanabilir. Nano ölçekli materyallerin hücrelere girme derecesi, nüfuz ettikleri alanlar, hücrelerdeki birikimi ve vücutta yer değiştirmesi araştırılması gereken konulardan bazılarıdır. Yaklaşık 50 nm'lik nanopartiküller solunum yoluyla hücrelere ve akciğerlere girebilirken, 30 nm'dekiler kan ve beyin bariyerinden geçebilirler. Sonuçta, bu nano yapılar, solunum sisteminden kan dolaşım sistemine ve daha sonra karaciğere, dalağa, kemik iliğine, kalbe, beyine ve diğer organlara taşınabilirler. Titanyum dioksit ve karbon tüp vb. bazı nanopartiküller solunduğunda

akciğerlerde birikebilir ve pulmoner enflamasyon, pnömoni, pulmoner granülom ve oksidatif stres gibi kronik hastalıkları tetikleyebilir. Tek başına partikül boyutunu dikkate alarak toksisite hakkında genel sonuçlara ulaşmak hala mümkün değildir. Buna göre, nanopartiküllerin potansiyel zararlı materyaller olarak ele alınması gerektiği öne sürülmüştür (Chau vd., 2007).

### **1.8. Uçucu Yağlar ve Emülsiyonları**

Uçucu yağ bileşikleri, dokulara nüfuz edebilen, tüm hedef organlara ulaşabilen ve sistemik dolaşıma geçebilen yağda çözünen moleküllerdir. Uçucu yağların, bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisi yanında sağlığın korunması ve geliştirilmesi için kullanımları vardır. Bununla birlikte, suda çözünürlüklerinin düşük olması ve kararsızlıkları, yüksek uçuculuk ve yan etkileri nedenleriyle tedavideki uygulamaları sınırlıdır (Kohlert vd., 2002; Başer ve Buchbauer, 2020).

Terapötik olarak uçucu yağları kullanmanın yolu genellikle inhalasyondur ancak oral ve harici uygulamalar da etkin yollardandır. Seyreltilmiş uçucu yağ formülasyonları kullanılan harici uygulamalar genellikle güvenlidir, ancak bazı uçucu yağlar iritan etki gösterebilmektedir. Bilindiği üzere, özellikle turuncgil yağları UV'ye duyarlıdır ve uygulandıktan sonraki 4 güne kadar güneş ışığına maruz kalındığında cildin tahrişine neden olarak malign değişimleri tetikleyebilir. Bazı yağlar ise doğrudan solunum için önerilmez; solunumu durumunda konsantre buharların göz tahrişine neden olmaması için uçucu yağ difüzörünün yakınında durulmaması önerilir (Franz, 2010; Bilia vd., 2014). Saf uçucu yağlar, cilde uygulandığında sistemik absorpsiyona neden olabilirler ve sonuçta konvülsiyon gibi ciddi yan etkiler görülebilmektedir (Bilia vd., 2014).

GRAS kategorisindeki uçucu yağlar genellikle süt, soya sütü, zeytinyağı vb. ile seyretilerek oral olarak kullanılabilirler. Çoğu uçucu yağ bileşeni glukuronat veya sülfatla konjuge edilerek polar bileşikler şeklinde böbrekler tarafından elimine edilmekte veya ciğerler yoluyla CO<sub>2</sub> olarak atılmaktadır (Kohlert vd., 2000). Bir çalışmada, (-)-mentol'ün oral uygulanmasından sonra mentol içeriğinin %35'inin renal olarak “mentol glukuronid” olarak atıldığı ve kimyasal olarak “timol, karvakrol, limonen ve öjenol”ün olduğu belirlenmiştir. Oral uygulamadan sonra idrarda ve plazmada, sülfat ve glukuronit formları uygun analizler ile saptanmıştır (Bilia vd., 2014).

Uçucu yağların ve doğal biyoaktif bileşiklerin çeşitli nano formülasyonlarının elde edilmesi; ilaç salımını kontrol etmek, aktif maddelerin fiziksel stabilitesini arttırmak, çevre ile olan etkileşimlerden korumak, uçuculuklarını azaltmak, biyolojik aktivitelerini arttırmak ve toksisiteyi azaltmak için uygulanabilir ve etkili bir yaklaşımdır (Bilia vd., 2014; El Asbahani vd., 2015; Flores vd., 2011). Uçucu yağlar, nano taşıyıcı sistemler ile inhalasyon ve oral uygulamalarında; burun, akciğer, oral boşluk, mide ve bağırsağın mukozal yapısıyla karşılaşılır. Nanoemülsiyonların mukusa yapışması, nano sistemin burunda kalma süresini arttırmak ve etken maddenin absorpsiyonunu ve biyoyararlılığını arttırmak için kullanılabilir (Bilia vd., 2014).

## **1.9. Emülsiyonların Uygulamaları**

### **1.9.1. Topikal yol**

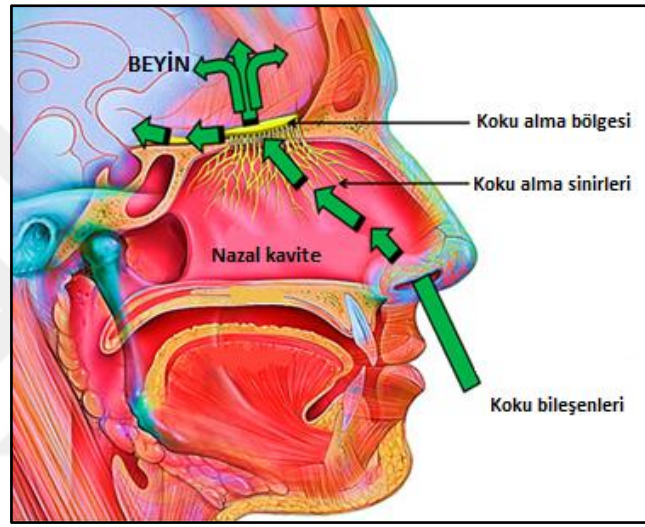
Birçok ilacın haricen yani topikal yoldan emilimi düşüktür ve bu nedenle zayıf etkinliğe neden olurlar. Ciltten penetrasyonu arttıran toksik maddelerle karşılaştırıldıklarında, nano ve mikro boyuttaki Y/S emülsiyonları daha etkili ve güvenli olarak kabul edilmektedir. Genellikle, Y/S emülsiyonları, lipofilik aktif maddeler için yüksek çözünürlük kapasitesine sahiptirler. Transdermal ilaç dağıtımında nanoemülsiyonların kullanımı, bazı ilaçların transdermal absorpsiyon kapasitesini, terapötik etkinliğini ve biyoyararlanımını genelde olumsuz etkileri olmadan arttırmaktadır (Keservani ve Sharma, 2018; Kumar ve Singh, 2012; Chime vd., 2014). Yapılan bir çalışmada, transdermal ilaç dağıtımı için kafeinin nanoemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir ve bu şekilde ciltteki geçirgenlik parametrelerinde artış gözlenmiştir (Schneider vd., 2009; Prow vd., 2011).

Son zamanlarda, dermokozmetiklerin kontrollü taşınması ve özellikle cilt katmanlarında aktif bileşenlerin optimum dağılımı için nanoemülsiyonlar giderek önem kazanmaktadır. Piroxicam, pilokarpin, indometasin, siklosporin A vb. lipofilik ilaçlarının Y/S emülsiyonu formunda oküler uygulamadan sonra göz biyoyararlanımının artması sağlanmıştır (Kumar ve Singh, 2012).

### **1.9.2. İntranazal yol**

Nazal boşluk, enzimatik aktivitelerin az olması, immünoaktif bölgelerin çok bulunması ve orta derecede geçirgen epitelyuma sahip olmasından dolayı etkin ilaç iletim

bölgelerinden biridir (Keservani ve Sharma, 2018; Pires vd., 2009). Koku alma sinir uçlarının bulunduğu insan olfaktör (koku alma) bölgesi (Şekil 1.6), burun boşluğunun toplam yüzey alanının yaklaşık %1,25-10'unu temsil eden 2–12,5 cm<sup>2</sup>'lik bir alanı kaplar. Olfaktör epitel ile beyin arasında bulunan olfaktör ve trigeminal sinirlerin sağladığı doğrudan bağlantı sayesinde, nazal mukozadan beyine ilaç hedeflemesi sağlanabilir. Nazal dozlar genellikle oral dozlardan 2-10 kat daha düşüktür ve nazal yolla verilen ilaçların karaciğeri doğrudan geçmesi büyük bir avantaj olarak görülmektedir (Bonferoni vd., 2019).



Şekil 1.6. Koku bileşenlerinin inhalasyon yoluyla beyne ulaşması (Aderibigbe, 2018).

Literatürde, ilaçlarla yüklü nanoemülsiyonların intranazal kullanımı ile Alzheimer hastalığı, migren, depresyon, şizofreni, Parkinson hastalığı, menenjit vb. gibi hastalıkların tedavi edilebilir olduğu bildirilmiştir (Bonferoni vd., 2019; Kumar vd., 2008; Mistry vd., 2009). Burun yoluyla beyne ulaşması için nanoemülsiyonların kullanımının literatürdeki ilk örneklerinden biri; antipsikotik ilaç risperidon nanoemülsiyonlarıdır. Risperidon nanoemülsiyonları, yağ fazı (%8, a/a) olarak Capmul MCM ve sürfaktan olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanmıştır (Kumar vd., 2008 ve 2009; Patel vd., 2011; Bonferoni vd., 2019). Bhanushali ve diğerleri (2009), yaptıkları bir çalışmada migren baş ağrılarını iyileştirmek için kullanılan rizatriptan benzoatın uzun süreli etkisini intranazal nanoemülsiyon ve jel formülasyonları ile sağlamışlardır.

*Curcuma longa* L. (Zerdeçal)'nın köklerinden elde edilen fenolik bir bileşen olan kurkuminin; Alzheimer hastalığı hayvan modellerinde hafıza ve bilişsel eksiklikleri iyileştirdiği bulunmuştur (Agrawal vd., 2010). Bununla birlikte, bu ilacın etkinliği, suda düşük çözünürlüğü, gastrointestinal sistemden zayıf emilimi ve hızlı metabolizması nedenleriyle sınırlıdır. Sood ve diğerleri (2014), intranazal uygulama ile SSS hedefli olarak, kurkumin yüklü nanoemülsiyonları kendiliğinden nanoemülsifikasyon yöntemi kullanılarak hazırlamışlardır.

Resveratrol, üzüm ve kırmızı şarapta bulunan biyolojik olarak aktif bir bileşiktir ve resveratrol içeren Y/S nanoemülsiyonları kendiliğinden emülsifikasyon ve ardından yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleriyle hazırlanmıştır. Bu çalışmada, yağ fazı olarak Vitamin E ve Sefsol, sürfaktan olarak Tween 80 ve yardımcı sürfaktan madde olarak Transcutol P kullanılmıştır (Pangeni vd., 2014). Bonferoni ve diğerlerinin (2019), Wistar sıçanları üzerinde yaptıkları beyin hedefleme çalışmalarında; resveratrol nanoemülsiyonlarının nazal uygulamasından sonra beyinde nispeten daha yüksek resveratrol konsantrasyonuna ulaşmışlardır.

*Nigella sativa* L. (Çörek otu) tohumlarından elde edilen uçucu yağın bileşenlerinden biri olan timokinonun antioksidan etkili ve serebral iskemi tedavisinde faydalı olduğu bilinmektedir. Ancak, timokinonun suda çözünürlüğünün düşük olması ve hızlı eliminasyonu nedenleriyle biyoyararlanımı zayıftır. Ahmad ve diğerleri (2016) tarafından geliştirilen timokinon nanoemülsiyonları (yaklaşık 100 nm); yağ fazı olarak oleik asit, sürfaktan maddeler olarak Tween 20/labrasol/kremofor ve yardımcı sürfaktan olarak karbitol kullanılarak iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. İlgili çalışmada, Wistar sıçanları üzerinde yapılan intranazal çalışmalar, intravenöz uygulamalara kıyasla beyinde ilaç biyoyararlanımının arttığını göstermişlerdir (Bonferoni vd., 2019).

### **1.9.3. Parenteral yol**

Parenteral yol, düşük biyoyararlanım ve dar terapötik endeksli aktif maddeler için kabul gören en yaygın ve en etkili ilaç uygulama yöntemlerinden biridir. Diazepam nispeten yüksek lipofilik özelliğe sahiptir, bu nedenle klasik su bazlı preparatlarda (Valium® ve Stesolid®) çözülmesi için propilen glikol, fenil karbinol ve etanol gibi çözücülerin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu çözücülerin kullanılması, hasta üzerinde ağrı ve tromboflebiti oluşturmaktadır. Diazemuls® (Kabi-Pharmacia) olarak bilinen diazepam nanoemülsiyon formülasyonunun geliştirilmesi ile; bu yan etkilerin azaltılması,

diazepam dağılım aşamalarının ve eliminasyonun Valium®'a benzer şekilde yapılması sağlanmıştır. Diazepam ile birlikte; propofol, deksametazon, etomidat, flurbiprofen, prostaglandin E1 vb. ilaçların da parenteral nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır (Chime vd., 2014).

#### 1.9.4. Antimikrobiyal nanoemülsiyonlar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; nanoemülsiyonların, birçok bakteri, virüs ve fungusla karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu bildirilmiştir. Nanoemülsiyon damlacıkları, lipit içeren organizmalarla karşılaştığında emülsiyonun katyonik yükü ile patojen üzerindeki anyonik yük arasında elektrostatik etkileşim gözlenir. Yeterli miktarda nanoemülsiyon damlacığı patojenle birleştiğinde, emülsiyon içinde tutulan enerjinin bir kısmını serbest bırakır. Hem aktif bileşen hem de salınan enerji, patojenin lipit zarının dengesini bozarak hücre lizisi ve ölümüyle sonuçlanır (Keservani ve Sharma, 2018; Kumar ve Singh, 2012).

Yapılan çalışmalarda, uçucu yağ nanoemülsiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin, emülsiyon sistemlerinin bileşimine göre değiştiği gözlenmiştir. Liang ve diğerlerinin 2012 yılındaki çalışmasında, serbest yağ ile karşılaştırıldığında, modifiye nişasta ile stabilize edilmiş *Mentha piperita* (tıbbi nane) uçucu yağı nanoemülsiyonları, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı daha etkili ve uzun süreli antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Liang vd., 2012). Ghosh ve diğerlerinin 2013 yılında yapmış olduğu çalışmada ise ultrasonik emülsifikasyonla hazırlanmış Tween 80 ile formüle edilmiş *Cinnamomum zeylanicum* (Seylan tarçını) uçucu yağının nanoemülsiyonu, *Bacillus cereus*'a karşı nispeten daha fazla antibakteriyel etki gösterdiği gözlenmiştir (Ghosh vd., 2013-1). Benzer şekilde, Landry ve diğerlerinin (2012) çalışmasında Tween 80 ile kendiliğinden emülsifikasyonla elde edilen karvakrol nanoemülsiyonları, *Salmonella enterica*, *Enteritidis* sp. ve *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etkili bulunmuştur (Landry vd., 2014). Bunun yanında, Terjung ve diğerlerinin (2012) yapmış olduğu çalışmada ise karvakrol ve öjenol nanoemülsiyonları, *E. coli* ve *Listeria innocua*'ya karşı makroemülsiyondan göreceli olarak daha az antibakteriyel etkili bulunmuştur.

### 1.9.5. Fitofarmasötikler ve nanoemülsiyonlar

Bilindiği üzere birçok bitkisel aktif bileşen; asidik pH'da ve karaciğer metabolizmasında instabilite sorunu nedeniyle, kanda terapötik konsantrasyonun altında bir ilaç düzeyine neden olmaktadır (Goyal vd., 2011). Bunun yanında, çeşitli bitki ekstraktları ve bitkisel aktif maddeler; *in vitro* biyoetkinliğe sahip olmalarına rağmen, zayıf lipit çözünürlüğü ve/veya büyük moleküler boyutları nedeniyle zayıf absorpsiyon ve zayıf biyoyararlanım sağlayarak nispeten daha az *in vivo* etki gösterirler veya hiç etki göstermezler. Standardize edilmiş bitki ekstraktları, flavonoidler, terpenoidler, tanenler, ksantonlar gibi polar bitkisel etken maddeler, nanoemülsiyonlar gibi yeni yaklaşımlarla uygulandıklarında biyolojik membrandan geçmelerini sağlayan daha iyi absorpsiyon profili gösterirler ve biyoyararlanımda artışa neden olurlar. Ayrıca; nano formların (polimerik nanopartiküller ve nanokapsüller, lipozomlar, katı lipit nanopartikülleri, fitozomlar ve nanoemülsiyon vb.) geliştirilmesi sayesinde; çözünürlük ve biyoyararlanımın artırılması, toksisiteden korunma ve farmakolojik etkinin artırılması vb. mümkün olmuştur (Ajazuddin, 2010). Bunlara örnek olarak, kolşisin nanoemülsiyonu; izopropil miristat, öjenol, Tween 80, etanol ve su ile hazırlanmıştır ve bu sayede kolşisinin bağırsak emiliminin belirgin olarak artırıldığı gösterilmiştir (Shen vd., 2011). Genistein'in farklı deneysel sistemlerde antikanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş, ancak zayıf biyoyararlanımı nedeniyle klinik ortamda aynı etkiler elde edilememiştir. Bir çalışmada genisteinin, yumurta lesitini, orta zincir trigliseritleri ve sudan oluşan topikal nanoemülsiyon formülasyonu, kendiliğinden emülsifikasyonla oluşturulmuş, bu şekilde biyoyararlanım artırılmıştır (Silva vd., 2009). Bir başka çalışmada ise Y/S nanoemülsiyon formülasyonu ile kurkumin'in anti-enflamatuvar etkinliği artırılmıştır (Wang vd., 2008).

### 1.10. Santral Sinir Sistemi (SSS) ve Nanoteknoloji

Beyin, işlevi için gerekli besinleri sağlayan özel bir kılcal endotelial hücreler sisteminden oluşan ve kan-beyin bariyeri (KBB) olarak adlandırılan yüksek oranda güçlendirilmiş membran sistemi ile yabancı organizmalardan ve zararlı kimyasallardan korunmaktadır. Bu nedenle, genellikle hidrofilik ve yüksek moleküler ağırlıklı olan ilaçları beyne hedeflemeyle ilişkili çeşitli problemler vardır (Pardridge, 1999). Nazal epitelyum; yüksek kan akışı, gözenekli endotelial zar, geniş yüzey alanı ve ilk geçiş metabolizmasının önlenmesi gibi avantajlara sahiptir. Nazal boşluk, olfaktör bölge

sayesinde beyin ile doğrudan bağlantı sağlayarak beyinde ilaç emilimine izin vermektedir (Pires vd., 2009).

Son zamanlardaki araştırmalar, erken aşamalarda ortaya çıkan beyin hastalıklarında olfaktör işlev bozukluğunun varlığını doğrulamaktadır. Özellikle, multipl skleroz (MS) hastalarında koku değişiklikleri nadiren bildirilmesine rağmen, koku alma duyusu sıklıkla bozulmaktadır. Koku alma bozukluğunun da nörolojik hastalıkların şiddeti ile ilişkili olabildiği bildirilmiştir. Olfaktör disfonksiyon aynı zamanda Parkinson hastalığında belirtilen erken aşamada ve sık görülen bir semptomdur (Strous ve Shoenfeld, 2006).

Nanoteknoloji, beyne spesifik ilaç verme ve beyinde diagnostik olarak görüntüleme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. İnorganik nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller, nano kristaller, karbon nanotüpler, dendrimerler, altın nanopartiküller, nanoemülsiyonlar ve manyetik nanopartiküller SSS'ne ilaç taşınması için kullanılan farklı tür nanopartiküllerdir. (Singh vd., 2016). İntranazal yoldan beyin hedefleme amaçlı olarak; estradiol polimerik nanopartikülleri, nimodipin nanopartikülleri ve risperidon nanoemülsiyonu geliştirilmiştir. Polielektrolit polimerler gibi mukoyapışkan ajanların formülasyona eklenmesi, formülasyonun burun mukozası üzerinde tutulmasına yardımcı olmaktadır ve bu şekilde ilacın koku alma bölgesine ve buradan beyine salımlı olarak verilmesi sağlanmaktadır (Singh vd., 2016; Alam vd., 2010). Bhanushali ve diğerlerinin (2009), yapmış olduğu çalışmada; uzun süreli etki, kontrollü salım ve ilacın beyin dokularına doğrudan hedeflenmesi için intranazal rizatriptan nanoemülsiyon ve jel formülasyonları geliştirilmiştir. Omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin olan yağlarla hazırlanan nanoemülsiyonların, KBB de dahil olmak üzere biyolojik engellerin aşılmasında çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Vyas vd., 2008; Shah vd., 2013).

#### **1.10.1. SSS'de anti-enflamatuvar etki**

Enflamasyon, hasarlı beyin dokusunu hasar almamış alandan izole eden, hasarlı hücreleri yok eden ve hücre dışı matrisi onaran koruyucu bir mekanizmadır. Birçok enflamatuvar reaksiyon kendiliğinden düzelir, ancak şiddetli kronik ve akut enflamasyonların beyin hasarına yol açtığı bilinmektedir (Phillis vd., 2006).

Eikosanoitler olarak adlandırılan biyolojik olarak aktif lipid molekülleri üreten siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) enzimlerinin enflamasyona neden olduğu

bilinmektedir. SSS hastalıklarının, enflamasyon ile ilişkisinin de bu enzimlerin artışına bağlı olduğu düşünülmektedir (Manev vd., 2011). Kronik enflamasyon; romatoid artrit, ateroskleroz, kalp hastalığı, Alzheimer, astım, multipl skleroz, diyabet, yaşlanma, enfeksiyonlar, gut, enflamatuvar bağırsak gibi dejeneratif hastalıkların gelişimini arttırmaktadır (Vishal vd., 2014; Lucas vd., 2006).

LOX, moleküler oksijeni araşidonik aside sokan ve demir içeren dioksijenazlardır. LOX, 75 ila 78 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir. İki alana katlanan tek bir polipeptit zincirinden oluşurlar. Büyük alan ağırlıklı olarak  $\alpha$ -sarmaldır ve substrat bağlama cebini içerir. Beyinde üç LOX formu bulunur; 5-LOX, 12-LOX ve 15-LOX. 5-LOX, beyin dokusunda ve sinir hücrelerinde sitoplazmada bulunur. Soya fasulyesinden elde edilen 5-LOX ve 15-LOX önemli ölçüde benzerlik gösterirler (Phillis vd., 2006). 5-LOX, lökotrienlerin biyosentezinde anahtar bir enzimdir ve Alzheimer hastalığı ve akut iskemik inme gibi SSS bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir (Costa de Silva vd., 2015).

#### **1.10.2. SSS'de antikolinesteraz etki**

Sinir sistemi fonksiyonunun temeli asetilkolin aracılı sinir iletimidir. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE), kolinerjik sinapslar yoluyla asetilkolin (ACh)'nin impuls iletimi etkisini sona erdirmek için asetilkolin bağlı esterin hidrolizini katalize eder. Alzheimer hastalarında özellikle kolinerjik nörotransmisyon etkilenir. Hafıza kaybı, sinir ileticisi asetilkolinin yetersizliğinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu hastalığın tedavisinde en umut verici yaklaşımlardan biri, asetilkolinesteraz inhibitörlerini kullanarak beyindeki asetilkolin seviyesini arttırmaktır (Barbosa Filho vd., 2006; Singhal vd., 2012). Asetilkolin hidrolizi, daha az spesifik bir enzim olan butirilkolinesteraz (BuChE, serum kolinesteraz veya pseudo kolinesteraz) tarafından da katalize edilebilir (Soreq ve Seidman, 2001).

Antikolinesteraz etkiye sahip madde sayısı ve çeşitliliği en fazla olan kimyasal sınıf alkaloidlerdir. Galantamin, Alzheimer hastalığının onaylanmış ilaçlardan biridir ve çeşitli demans formlarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, 1,8-sineol ve  $\alpha$ -pinen gibi bazı terpenoidlerin de asetilkolinesteraz inhibitörleri oldukları gösterilmiştir (Mendes vd., 2012).

### 1.11. Bitkisel Hammaddelerin SSS'ye Etkileri

SSS aktivitesi olan yapıları tanımlayarak alternatifler veya yeni tedaviler bulmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gomes vd., 2009). SSS'de antidepresan etkisi olan bitkilerin çoğunun, halk arasında anksiyolitik veya hipnotik olarak kullanıldığı bilinmektedir. Antik çağlardan beri; *Matricaria chamomilla* (Papatya), *Passiflora incarnata* (Çarkıfelek), *Valeriana officinalis* (Kediotu), *Melissa officinalis* (Melisa), *Mentha piperita* (Tıbbi nane) ve *Papaver somniferum* (Haşhaş) gibi çeşitli bitki kaynaklarından elde edilen birçok ilaç, uyku verici ve anksiyeteyi azaltmak için kullanılmıştır. Uyarıcı özelliğe sahip tanınmış bitkilerden bazıları; kahve (*Coffea arabica*), kakao (*Erythroxylum coca*), mate (*Ilex paraguariensis*) ve çay (*Camellia sinensis*)'dir. Bu bitkiler, SSS uyarıcı etkisiyle psikoaktif madde olarak kabul edilen alkaloit olan kafein (1,3,7-trimetilksantin) bakımından zengindir. *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron) preparatları depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan başlıca tıbbi ürünlerdir ve genellikle hiperisin bileşenine göre standardize edilmektedir. *H. perforatum*, sadece serotonin, noradrenalin ve dopamin değil, aynı zamanda gama-aminobutirik asit (GABA) ve L-glutamatın çeşitli nörotransmitterlerin nöronal alımı üzerinde açık bir inhibitör etki göstermiştir (Gomes vd., 2009; Mendes vd., 2012). *Valeriana officinalis* kökleri, sedatif ve antikonvülsan etkileri için kullanılmaktadır ve aktif bileşen olarak valepotriat denilen bir dizi nonglikozile iridoid içermektedir. *M. chamomilla*'nın çiçekleri, sedatif ve spazmolitik etkileri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Apigenin ve kamferol, monoaminoksidaz (MAO) A ve B inhibitörleri olarak araştırılmıştır (Mendes vd., 2012). *M. officinalis*, sedatif özellikleri için yaygın olarak kullanılan bir bitkidir ve anksiyolitik olarak da kullanılmaktadır. *M. officinalis*, GABA transaminaz aktivitesini inhibe eden ve beyindeki GABA seviyelerini arttıran yüksek içerikte rosmarinik asit, triterpenoid oleanolik asit ve ursolik asit içermektedir. *M. officinalis* uçucu yağı antioksidan ve antitümör aktiviteye sahiptir. Sağlıklı gönüllülerde yapılan klinik çalışmalar; *M. officinalis* ekstresi kullanımının, stresi azalttığı, aynı zamanda ruh halini değiştirdiği ve sakinliği artırdığı, ancak kognitif fonksiyonlarda bozulmaya neden olabileceğini göstermektedir (Gomes vd., 2009; Mendes vd., 2012).

Bu tez çalışması kapsamında, Anadolu'da halk arasında, SSS hastalıklarında kullanılan bitkiler, kullanılan bitki kısımları ve nasıl kullanıldıkları Türkiye adresli çalışmalar kaynak olarak kullanılarak literatür taraması ile incelenmiştir ve Tablo 1.2'de listelenmiştir. Buna göre, en az 93 farklı bitkinin çeşitli yöntemlerle geleneksel olarak

kullanıldığı belirlenmiştir. Bu bitkiler arasındaki *Hypericum* sp., *Lavandula* sp., *Mentha* sp., *Origanum* sp., *Salvia* sp., *Tilia* sp. ve *Valeriana* sp. sedatif, uyarıcı, analjezik ve hipnotik gibi etkileri nedeniyle uykusuzlukta, stres ve psikolojik problemlerde, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında kullanıldığı bildirilmiştir (Sargın, 2015; Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010; Çakılcıoğlu vd., 2011; Akan ve Bakır, 2015; Genç ve Özhatay, 2006; Korkmaz ve Karakurt, 2014; Polat vd., 2015; Altundağ ve Öztürk, 2011; Tetik vd., 2013; Sargın vd., 2015-1; Güzel vd., 2015; Sağiroğlu vd., 2013).

**Tablo 1.2.** Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri.

| Bitkinin Latince ismi                                     | Halk arasında              | Kullanım amacı                                                  | Kullanım şekli                                      | Kullanılan kısmı      | Kaynak                                    |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| <i>Althaea officinalis</i> L.                             | Hatmi                      | Sedatif etkili                                                  | -                                                   | -                     | Polat vd., 2015                           |
| <i>Angelica sylvestris</i> L.                             | Melek otu                  | Sinirleri kuvvetlendirir. Migrende kullanılmaktadır.            | Çay                                                 | Bitkinin tamamı       | Korkmaz ve Karakurt, 2014                 |
| <i>Artemisia absinthium</i> L.                            | Pelin, pelinotu, acı pelin | Sedatif ve antidepresan etkili, baş ağrısında kullanılmaktadır. | İnfüzyon                                            | Toprak üstü kısımları | Altundağ ve Öztürk, 2011; Güzel vd., 2015 |
| <i>Anthemis cretica</i> L. subsp. <i>anatolica</i> Boiss. | Papatya                    | Rahatlatıcı etkili                                              | -                                                   | -                     | Tetik vd., 2013                           |
| <i>Anthemis fumariifolia</i> Boiss.                       | Papatya, yoğurt çiçeği     | Sedatif etkili                                                  | İnfüzyon                                            | Çiçekler              | Tuzlacı ve Şenkardeş, 2011                |
| <i>Anthemis tinctoria</i> L. var. <i>tinctoria</i>        | Papatya, sarı papatya      | Sedatif etkili                                                  | İnfüzyon                                            | Çiçekler              | Tuzlacı ve Şenkardeş 2011                 |
| <i>Achillea crithmifolia</i> Waldst. et Kit.              | Civanperçemi, mayasıl otu  | Sinir sistemi hastalıklarında                                   | İnfüzyon                                            | Toprak üstü kısımları | Tuzlacı vd., 2010.                        |
| <i>Alchemilla crinita</i> Buser                           | -                          | Sakinleştirici                                                  | -                                                   | Toprak üstü kısımları | Saraç vd., 2013                           |
| <i>Avena sativa</i> L.                                    | Yulaf                      | Sedatif etkili                                                  | -                                                   | -                     | Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010             |
| <i>Boswellia serrata</i> L.                               | Akgünlük                   | Yatıştırıcı                                                     | 50 gr 1 kg bal ile karıştırılır günde 2 kez 1 kaşık | Reçine                | Akan ve Bakır, 2015                       |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2. (Devam) Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri**

| Bitkinin Latince ismi                         | Halk arasında                                        | Kullanım amacı                                 | Kullanım şekli                                  | Kullanılan kısmı                                    | Kaynak                                                                                           |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Calluna vulgaris</i> L. Hull               | Funda, süpürge otu                                   | Alzheimer hastalığında kullanılmaktadır.       | Çay                                             | Yaprak ve çiçekler                                  | Akan ve Bakır, 2015                                                                              |
| <i>Carduus nutans</i> L. subsp. <i>nutans</i> | Eşek dikenini                                        | Sedatif etkili                                 | -                                               | -                                                   | Hayta vd., 2014                                                                                  |
| <i>Cardaria draba</i> L.                      | Tahliş                                               | Sedatif etkili, uykusuzlukta kullanılmaktadır. | -                                               | -                                                   | Mükemre vd., 2015                                                                                |
| <i>Centaurea kurdica</i> Reichardt            | Pamuk dikenini                                       | Sedatif etkili, sinirleri yatıştırıcı          | -                                               | -                                                   | Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010                                                                    |
| <i>Citrus sinensis</i> L.                     | Portakal                                             | Sinir sistemi hastalıklarında                  | -                                               | Meyve                                               | Akan ve Bakır, 2015                                                                              |
| <i>Colocasia esculenta</i> L. Schott          | Gölevez, gelevez                                     | Alzheimer hastalığında kullanılmaktadır.       | Düzenli olarak tüketilir.                       | -                                                   | Sargın, 2015                                                                                     |
| <i>Coriandrum sativum</i> L.                  | Kışniş                                               | Depresyon, sinirsel baş ağrıları               | Macun halinde dahilen                           | Tohumları; toprak üstü kısımları                    | Korkmaz ve Karakurt, 2014; Sarı A.O., 2010                                                       |
| <i>Corydalis erdelii</i> Zucc.                | Menekşe                                              | Sedatif etkili                                 | İnfüzyon                                        | Yapraklar                                           | Altundağ ve Öztürk, 2011                                                                         |
| <i>Cnicus benedictus</i> L.                   | Yumus, akhasan, şevketi bostan, akdiken, mayasıl otu | Sedatif etkili                                 | Çay olarak 2-3 gün günde iki kez bir çaybardağı | Toprak üstü kısımları                               | Polat ve Satıl, 2012.                                                                            |
| <i>Crataegus monogyna</i> L.                  | Yemişgen, alıç, arıç, kızlar yemişi                  | Sedatif etkili                                 | Dekoksiyon veya infüzyon                        | Çiçekli dal uçları, toprak üstü kısımları, meyveler | Çakılcıoğlu vd., 2011; Genç ve Özhatay, 2006; Altundağ ve Öztürk, 2011; Özdemir ve Alpınar, 2015 |
| <i>Crataegus orientalis</i> L.                | Kırmızı alıç                                         | Uykusuzta kullanılmaktadır.                    | Kaynatılarak dahilen                            | Dal ve meyveler                                     | Korkmaz ve Karakurt, 2014                                                                        |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2.** (Devam) Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri

| Bitkinin Latince ismi                    | Halk arasında                                                                  | Kullanım amacı                                                    | Kullanım şekli                                                                | Kullanılan kısmı                           | Kaynak                                                                                            |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Crataegus tanacetifolia</i> Lam. Pers | Sarı alıç                                                                      | Uykusuzta kullanılmaktadır.                                       | Kaynatılarak dahilen                                                          | Dal ve meyveleri                           | Korkmaz ve Karakurt, 2014                                                                         |
| <i>Crataegus aronia</i> L.               | -                                                                              | Insomnia ve strese kullanılmaktadır.                              | -                                                                             | -                                          | Polat vd., 2013                                                                                   |
| <i>Elaeagnus angustifolia</i> L.         | İğde                                                                           | Çiçeğinin kokusu zihin açıcı olarak kullanılmaktadır.             | Çiğ olarak veya kaynatılarak dahilen tüketilir.                               | Meyve ve çiçekleri                         | Korkmaz ve Karakurt, 2014                                                                         |
| <i>Ephedra major</i> Host                | Deniz üzümü                                                                    | Uyarıcı etkili                                                    | İnfüzyon                                                                      | Toprak üstü kısımları                      | Özdemir ve Alpınar, 2015                                                                          |
| <i>Eremurus spectabilis</i> M. Bieb.     | Çiriş kökü                                                                     | Sedatif etkili                                                    | Kaynatılarak dahilen                                                          | Kökleri                                    | Özdemir ve Alpınar, 2015                                                                          |
| <i>Ginkgo biloba</i> L.                  | Mabed ağacı                                                                    | Hafıza güçlendirici                                               | Dekoksiyon                                                                    | Yaprakları                                 | Güzel vd., 2015                                                                                   |
| <i>Hypericum perforatum</i> L.           | Katran otu, kantaron, binbirdelik otu, bağtov, adaçayı, sarı kantaron, alaçayı | Sedatif etkili Depresyon, stres ve uykusuzlukta kullanılmaktadır. | İnfüzyon veya dekoksiyonu 2-3 hafta boyunca günde 2 kere kaynatılarak içilir. | Toprak üstü kısımları, çiçek ve yaprakları | Sargın, 2015; Çakılcıoğlu vd., 2011; Akan ve Bakır, 2015; Genç ve Özhatay, 2006; Polat vd., 2015. |
| <i>Hyoscyamus niger</i> L.               | -                                                                              | Sedatif etkili                                                    | İnfüzyon                                                                      | Tohumları                                  | Özdemir ve Alpınar, 2015                                                                          |
| <i>Humulus lupulus</i> L.                | Şerbetçi otu                                                                   | Uyarıcı ve sedatif etkili depresyonda kullanılmaktadır.           | İnfüzyon                                                                      | Yaprakları, çiçekleri                      | Akan ve Bakır, 2015; Güzel vd., 2015                                                              |
| <i>Hypericum scabrum</i> L.              | Sancı otu, öksürük otu                                                         | Sedatif etkili                                                    | İnfüzyon veya dekoksiyon                                                      | Toprak üstü kısımları                      | Altundağ ve Öztürk, 2011; Özdemir ve Alpınar, 2015                                                |
| <i>Hypericum triquetrifolium</i> Turra   | Katran, katran otu, kepir                                                      | Sedatif etkili Depresyonda kullanılmaktadır.                      | 2-3 hafta boyunca günde 2 kere kaynatılarak içilir.                           | -                                          | Sargın, 2015; Tetik vd., 2013                                                                     |
| <i>Helichrysum plicatum</i> DC.          | Herdemtaze                                                                     | Antidepresan etkili                                               | İnfüzyonu veya dekoksiyon                                                     | Toprak üstü kısımları                      | Altundağ ve Öztürk, 2011                                                                          |
| <i>Jasminum officinale</i> L.            | Yasemin                                                                        | Nöroleptik, sinir yatıştırıcı                                     | -                                                                             | -                                          | Güler vd., 2015                                                                                   |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2.** (Devam) *Anadolu’da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri*

| Bitkinin Latince ismi               | Halk arasında                                                                                       | Kullanım amacı                                                          | Kullanım şekli                                                                                                                                                                             | Kullanılan kısmı                                   | Kaynak                                                                       |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Juglans regia</i> L.             | Ceviz                                                                                               | Beyin gelişimini destekler, zihni açar, unutkanlığı engeller.           | -                                                                                                                                                                                          | Taze meyve kabukları                               | Korkmaz ve Karakurt, 2014                                                    |
| <i>Lavandula stoechas</i> L.        | Karabaş, karabaş otu, karabaş kekiği, kafa süpürgesi, eşek zahteri, çalı kekiği, mor kekik, karağan | Beyin hastalıkları, insomnia, stres, asabilik, epilepsi, sedatif etkili | Çayı 3-4 hafta boyunca günde 3 kez bir çay bardağı. Bir yemek kaşığı günde 2-3 defa bal, kekik ve siyah kimyon tohumlarıyla 1-2 hafta yenir. 1-5 hafta günde 3 kez bir çay bardağı içilir. | Dal, gövde, çiçek ve yapraklar                     | Sargın,2015; Korkmaz ve Karakurt, 2014; Güzel vd., 2015; Sağıroğlu vd., 2013 |
| <i>Laurus nobilis</i> L.            | Defne                                                                                               | Sedatif etkili Sinir ağrılarını dindirir.                               | Suda kaynatılarak haricen uygulanır.                                                                                                                                                       | Toprak üstü kısımları, yapraklar                   | Akan ve Bakır, 2015; Genç ve Özhatay, 2006                                   |
| <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. | Lavanta                                                                                             | Psikolojik problemlerde                                                 | Çay                                                                                                                                                                                        | Çiçek                                              | Korkmaz ve Karakurt, 2014                                                    |
| <i>Lotus corniculatus</i> L.        | Gazalboynuzu                                                                                        | Sedatif etkili                                                          | Dekoksiyon                                                                                                                                                                                 | Toprak üstü kısımları                              | Altundağ ve Öztürk, 2011                                                     |
| <i>Nigella sativa</i> L.            | -                                                                                                   | Insomnia’da kullanılmaktadır (özellikle bebeklerde).                    | Toz edilmiş bitki şekerle karıştırılarak uyumadan önce bir çaykaşığı tüketilir.                                                                                                            | Tohumlar                                           | Kültür, 2014                                                                 |
| <i>Origanum vulgare</i> L.          | Kekik, anık                                                                                         | Sedatif etkili Epilepside kullanılmaktadır.                             | -                                                                                                                                                                                          | -                                                  | Çakılcıoğlu vd., 2011 Polat vd., 2013                                        |
| <i>Origanum majorana</i> L.         | Mercanköşk                                                                                          | Sedatif etkili Uykusuzluk ve migrende kullanılmaktadır.                 | Çay olarak ve/veya Taze bitki olarak tüketilir.                                                                                                                                            | Toprak üstü kısımları, yapraklar ve çiçekli dallar | Korkmaz ve Karakurt, 2014; Altundağ ve Öztürk, 2011                          |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2.** (Devam) Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri

| Bitkinin Latince ismi               | Halk arasında                          | Kullanım amacı                                                                                    | Kullanım şekli                | Kullanılan kısmı                | Kaynak                                                                                            |
|-------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Ocimum basilicum</i> L.          | Rıhon, rıhan, rehan, reyhan, fesleğen  | Depresyon, migren, asabılık ve uykusuzlukta kullanılmaktadır.                                     | Çay                           | Bitkinin tamamı                 | Polat vd., 2013; Korkmaz ve Karakurt, 2014; Güzel vd., 2015; Güler vd., 2015; Sağıroğlu vd., 2013 |
| <i>Plantago lanceolata</i> L.       | Sinirli ot, sinirotu                   | Sedatif etkili                                                                                    | Dahilen                       | Taze yapraklar                  | Genç ve Özhatay, 2006                                                                             |
| <i>Plantago major</i> L.            | Kara kabarcık, sinirli ot, sinirotu    | Sedatif etkili                                                                                    | Dekoksiyon                    | -                               | Genç ve Özhatay, 2006                                                                             |
| <i>Peganum harmala</i> L.           | Üzerlik, üzerlikotu, nazar otu         | Sedatif etkili, Sinir sistemini uyarıcı, Parkinson hastalığında ve uykusuzlukta kullanılmaktadır. | İnfüzyon                      | Tohumlar                        | Özdemir ve Alpınar, 2015; Akan ve Bakır, 2015                                                     |
| <i>Passiflora</i> sp.               | Çarkıfelek çiçeği                      | Sedatif etkili, hipnotik                                                                          | -                             | -                               | Güzel vd., 2015                                                                                   |
| <i>Papaver rhoeas</i> L.            | Gelincik                               | Sedatif ve uyutucu etkili, insomnia'da kullanılmaktadır.                                          | İnfüzyon veya dekoksiyon      | Toprak üstü kısımlar            | Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010; Altundağ ve Öztürk, 2011                                           |
| <i>Pimpinella armena Schischk.</i>  | Anason                                 | Sedatif etkili                                                                                    | İnfüzyon                      | Meyveleri                       | Özdemir ve Alpınar, 2015                                                                          |
| <i>Prangos ferulacea</i> L.         | -                                      | Uyarıcı etkili                                                                                    | Dekoksiyon                    | Toprak üstü kısımları           | Altundağ ve Öztürk, 2011                                                                          |
| <i>Mandrago officinarum</i> L.      | Adamotu                                | Sakinleştirici, Parkinson ve Alzheimer hastalığında kullanılmaktadır.                             | Suda günde 1 gr toz           | Kökü                            | Akan ve Bakır, 2015                                                                               |
| <i>Matricaria chamomilla</i> L.     | Papatya, çiçekmastık, yoğurt çiçeği    | Sinirleri yatıştırıcı                                                                             | -                             | Çiçekler, dallar                | Akan ve Bakır, 2015                                                                               |
| <i>Mentha x piperita</i> L.         | Nane, nene                             | Sedatif etkili, İnsomnia'da kullanılmaktadır.                                                     | Günde 2-3 kez bir çay bardağı | -                               | Sargın, 2015; Tetik vd., 2013; Sargın vd., 2015-2                                                 |
| <i>Mentha longifolia</i> L.         | Yarpuz                                 | Sedatif etkili                                                                                    | Çiğnenir                      | -                               | Çakılcıoğlu vd., 2011; Tuzlacı ve Şenkardeş 2011                                                  |
| <i>Melilotus officinalis</i> L.     | Kokulu yonca                           | Sedatif etkili                                                                                    | İnfüzyon                      | Toprak üstü kısımlar, yapraklar | Özdemir ve Alpınar, 2015; Altundağ ve Öztürk, 2011                                                |
| <i>Micromeria myrtifolia</i> Boiss. | Topukluçay, boğumlu ot, kırkboğum çayı | Rahatlatıcı                                                                                       | 1-2 gün günde 1-2 çay bardak  | -                               | Sargın, 2015                                                                                      |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2.** (Devam) Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri

| Bitkinin Latince ismi                                          | Halk arasında                                  | Kullanım amacı                                                                                                                                      | Kullanım şekli                                                                              | Kullanılan kısmı                                     | Kaynak                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Melissa officinalis</i> L.                                  | Oğulotu, melisa, melis otu, arı otu, limon otu | Sedatif etkili, anksiyete, epilepsi, unutkanlık, insomnia, uykusuzluk, baş ağrısı, migren sinir, stres ve psikolojik problemlerde kullanılmaktadır. | Çayı 2 hafta günde 2 bardak tüketilir.                                                      | Toprak üstü kısımları, yaprakları, dalları ve çiçeği | Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010; Polat ve Satıl, 2012; Güzel vd., 2015; Koçyiğit ve Özhatay, 2006; Polat vd., 2015; Korkmaz ve Karakurt, 2014; Akan ve Bakır, 2015; Kaval vd., 2014 |
| <i>Micromeria myrtifolia</i> Boiss. veya <i>Micromeria</i> sp. | Kırkboğum                                      | Sedatif etkili                                                                                                                                      | -                                                                                           | -                                                    | Sargın vd., 2015-2                                                                                                                                                                |
| <i>Nepeta cataria</i> L.                                       | Kedinanesi                                     | Uyarıcı                                                                                                                                             | Dekoksiyon                                                                                  | Toprak üstü kısımları                                | Altundağ ve Öztürk, 2011                                                                                                                                                          |
| <i>Prangos pabularia</i> Lindl.                                | -                                              | Uyarıcı etkili                                                                                                                                      | Dekoksiyonu içilir.                                                                         | Toprak üstü kısımları                                | Altundağ ve Öztürk, 2011                                                                                                                                                          |
| <i>Petroselinum crispum</i> Mill.                              | Maydanoz tohumu                                | Sinir sistemi için faydalı                                                                                                                          | Kaynatılıp suyu tüketilir.                                                                  | Meyve                                                | Akan ve Bakır, 2015                                                                                                                                                               |
| <i>Pimpinella anisetum</i> Boiss.                              | Anason                                         | Uykusuzlukta kullanılmaktadır.                                                                                                                      | Çay olarak. Toz edilmiş bitki şekerle karıştırılarak uyumadan önce bir çaykaşığı tüketilir. | Bitkinin tamamı                                      | Korkmaz ve Karakurt, 2014; Kültür, 2014                                                                                                                                           |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L.                               | Kuşdili, biberiye                              | Sedatif etkili, Migren ve sinir rahatsızlıklarında kullanılmaktadır.                                                                                | 3-6 hafta günde 3 kez bir çay bardağı                                                       | Yaprakları, çiçek, toprak üstü kısımları             | Sargın, 2015; Sarı A.O., 2010                                                                                                                                                     |
| <i>Ruta chalepensis</i> L.                                     | Nemnemiye, sedefotu                            | Sedatif etkili                                                                                                                                      | -                                                                                           | -                                                    | Güzel vd., 2015                                                                                                                                                                   |
| <i>Rubus sanctus</i> Schreber                                  | -                                              | Sedatif etkili                                                                                                                                      | -                                                                                           | -                                                    | Polat vd., 2013                                                                                                                                                                   |
| <i>Salvia multicaulis</i> Vahl.                                | Boz kulak                                      | Sedatif etkili                                                                                                                                      | İnfüzyon                                                                                    | Toprak üstü kısımları                                | Özdemir ve Alpınar, 2015                                                                                                                                                          |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2.** (Devam) Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri

| Bitkinin Latince ismi                                | Halk arasında                    | Kullanım amacı                                                | Kullanım şekli                                | Kullanılan kısmı        | Kaynak                                     |
|------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Salvia officinalis</i> L.                         | Adaçayı, deve dili, acı elma otu | Alzheimer hastalığında, yorgunluk ve strese kullanılmaktadır. | Çay                                           | Toprak üstü kısımları   | Çakılcıoğlu vd., 2011; Akan ve Bakır, 2015 |
| <i>Sideritis montana</i> L.                          | Dağ çayı, yaylaçayı              | Uyarıcı etkili                                                | İnfüzyon                                      | Yaprakları ve çiçekleri | Özdemir ve Alpınar, 2015                   |
| <i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl.                  | -                                | Sedatif etkili insomnia'da kullanılmaktadır.                  | -                                             | -                       | Polat vd., 2013                            |
| <i>Solanum dulcamara</i> L.                          | Sofur, yaban yasemini            | Sedatif etkili                                                | İnfüzyon                                      | Çiçekli dal uçları      | Özdemir ve Alpınar, 2015                   |
| <i>Sideritis libanotica</i> Labill.                  | Adaçayı, dağ çayı, dağ kekiği    | Sedatif etkili                                                | İnfüzyon veya dekoksiyon                      | Yaprakları              | Güzel vd., 2015; Altundağ ve Öztürk, 2011  |
| <i>Smilax excelsa</i> L.                             | Lakidenzi, Zimbilaçi dikenli     | Beyin hücrelerini yeniler.                                    | -                                             | Meyve                   | Saraç vd., 2013                            |
| <i>Syzygium aromaticum</i> L.                        | Karanfil                         | Dikkat dağınıklığında kullanılmaktadır.                       | Çayın içine atılır veya çiğ olarak tüketilir. | Çiçek tomurcukları      | Korkmaz ve Karakurt, 2014                  |
| <i>Smyrniium connatum</i> Boiss.                     | -                                | Sedatif etkili                                                | İnfüzyon                                      | Yaprakları              | Özdemir ve Alpınar, 2015                   |
| <i>Thymus kotschyanus</i> Boiss.                     | -                                | Sedatif etkili                                                | -                                             | -                       | Polat vd., 2013                            |
| <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.                  | Çemen                            | Depresyon                                                     | -                                             | Tohumları               | Korkmaz ve Karakurt, 2014                  |
| <i>Teucrium chamaedrys</i> L. subsp. <i>Sinuatum</i> | -                                | Sedatif etkili                                                | -                                             | -                       | Polat vd., 2013                            |
| <i>Tanacetum balsamita</i> L.                        | Gıyakeçk                         | Uyarıcı etkili                                                | -                                             | -                       | Kaval vd., 2014                            |
| <i>Teucrium chamaedrys</i> L.                        | Keselmehmut                      | Sedatif etkili                                                | -                                             | -                       | Kaval vd., 2014                            |
| <i>Thymus kotschyanus</i> Boiss.                     | Çatırakuvi                       | Sedatif etkili                                                | -                                             | -                       | Kaval vd., 2014                            |
| <i>Tilia rubra</i> DC.                               | Ihlamur                          | Sakinleştirici                                                | Çay                                           | Yaprak ve çiçekler      | Korkmaz ve Karakurt, 2014                  |
| <i>Urtica dioica</i> L.                              | Isırgan                          | Sedatif etkili                                                | -                                             | -                       | Tetik vd., 2013.                           |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

**Tablo 1.2.** (Devam) Anadolu'da halk arasında santral sinir sistemine etkili bazı bitkiler, kullanılan kısımları ve kullanılma şekilleri

| Bitkinin Latince ismi                               | Halk arasında                    | Kullanım amacı                                                                                   | Kullanım şekli                                                     | Kullanılan kısmı                | Kaynak                                            |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Verbena officinalis</i> L.                       | Mine çiçeği                      | Uykusuzlukta ve gerginlikte kullanılmaktadır. Sinirleri yatıştırır.                              | 2 L suya 300 gr çiçeği demlenerek 2 ay aç karnına tüketilir.       | Yaprakları ve çiçekler          | Akan ve Bakır, 2015                               |
| <i>Vitis vinifera</i> L.                            | Asma cimin üzümü, karaerik üzümü | Hafıza kaybını azaltır.                                                                          | Su ve şeker ilave edilerek kaynatılır, üzüm suyu olarak tüketilir. | Meyveler                        | Korkmaz ve karakuş, 2015                          |
| <i>Valeriana officinalis</i> L.                     | Kedi otu                         | Sedatif etkili, depresyon, sinir hastalığı, uykusuzluğa karşı bağımlılık yapmadan sakinleştirir. | Çay                                                                | Kök ve yapraklar                | Çakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010 Akan ve Bakır, 2015 |
| <i>Valeriana alpestris</i> Stev.                    | Kedi otu                         | Sakinleştirici, sinirleri yatıştırıcı Psikolojik problemlerde, uykusuzlukta kullanılmaktadır.    | Çay                                                                | Kök                             | Korkmaz ve Karakurt, 2014                         |
| <i>Valeriana alliariifolia</i> Adams                | Kedi otu                         | Sedatif etkili                                                                                   | İnfüzyon veya dekoksion                                            | Toprak üstü kısımları ve kökler | Altundağ ve Öztürk, 2011                          |
| <i>Viscum album</i> L.                              | Çekem                            | Sedatif etkili                                                                                   | -                                                                  | -                               | Çakılcıoğlu vd., 2011                             |
| <i>Vicia faba</i> L.                                | Bakla                            | Alzheimer hastalığında kullanılmaktadır.                                                         | 3-4 parça tüketilir.                                               | -                               | Sargın, 2015                                      |
| <i>Xanthium orientale</i> L. subsp. <i>italicum</i> | Büyük pıtrak                     | Sedatif etkili                                                                                   | İnfüzyonu içilir.                                                  | Yapraklar                       | Özdemir ve Alpınar, 2015                          |
| <i>Zingiber officinale</i> Roscoe                   | Zencefil                         | Hafızayı kuvvetlendirir.                                                                         | Macun halinde veya çay olarak tüketilir.                           | Kök, yaprak                     | Korkmaz ve Karakurt, 2014                         |
| <i>Zizyphus jujuba</i> Mill.                        | Hünnap                           | Depresyon                                                                                        | Şurup olarak tüketilir.                                            | Yaprak                          | Korkmaz ve Karakurt, 2014                         |

- Herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

### 1.11.1. Uçucu yağların SSS etkileri

Uçucu yağlar, halk arasında olduğu gibi aromaterapi ve fitoterapide; ağrı kesme, gevşeme, kaygının azaltılması ve enerjinin artırılması için kullanılan terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Bilindiği üzere; olfaktör bölgeden absorbe olan uçucu bileşenler, lipofilik özelliklerinden dolayı beyne ulaşabilir (Angelucci vd., 2014). Uçucu yağların uyku, ruh hali, davranış, algı, antikonvülsif etkileri, epilepsi tedavisi, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi SSS üzerindeki etkileri üzerinde çok sayıda çalışma vardır (Dobetsberger ve Buchbauer, 2011; Başer ve Buchbauer, 2020).

Komori ve diğerlerinin (2006), sıçanlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada; kediotu (*Valeriana officinalis*) ve gül (*Rosa damacena*) uçucu yağı inhalasyonunun, pentobarbitinin neden olduğu uyku süresini önemli ölçüde uzattığı ve limon inhalasyonunun bunu önemli ölçüde kısalttığı belirlenmiştir. Doğal uykudaki elektroensefalografik çalışmalar ise gül inhalasyonunun uyku üzerinde herhangi bir anlamlı etki yaratmadığını belirlenmiştir. Ayrıca, kediotu inhalasyonunda uyku süresinde belirgin bir uzama, limon yağının inhalasyonunda uykuya dalmada gecikme olduğu gösterilmiştir.

Bir çalışmada, yasemin yağının önemli bir bileşeni metil jasmonat ve 1,8-sineolün beta dalgasını arttırdığını, alfa ve teta dalgalarını inhibe ettiğini bulmuşlardır (Sayowan vd., 2013; Hongratanaworakit, 2004). Gerçekleştirilen birçok çalışmada ise, lavanta yağının beyin dalgası aktivitesi, otonom sinir sistemi ve ruh durumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Lavanta yağı, tatlı badem yağı ile karşılaştırıldığında, teta ve alfa beyin faaliyetlerinin gücünü arttırdığı tespit edilmiştir. Lavanta uçucu yağının temel bileşenleri olan linalil asetat ve linalol, inhalasyon yoluyla vücuttan absorbe edilmektedir ve plazma seviyesinin yaklaşık 7 dakika içinde maksimum noktaya ulaştığı gözlenmiştir. Lavanta, sineol, sandal ağacı ve  $\alpha$ -pinen inhalasyonlarında rahatlatıcı bir etki (alfa dalga aktivitesinde artış) bulunmuştur. Koku moleküllerinin kiralitesinin çalışıldığı bir çalışmada, R(-)-linalol için rahatlatıcı etkiler ve S(+)-linalol için uyarıcı etkiler gözlenmiştir (Höferl vd., 2006). Sıklıkla kullanılan anksiyolitik uçucu yağlar arasında lavanta (*Lavandula angustifolia*), gül (*Rosa damascena*), portakal (*Citrus sinensis*), bergamot (*Citrus aurantium*), limon (*Citrus limon*) ve misk adaçayı (*Salvia sclarea*) bildirilmiştir (Mendes vd., 2012).

### 1.11.2. Tez kapsamında kullanılan bitkisel hammaddeler

#### 1.11.2.1. *Rosmarinus officinalis* L.

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) toprak üstü kısımlarından (Görsel 1.1) elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenleri arasında genellikle 1,8-sineol,  $\alpha$ -pinen, borneol ve kafur yer alır. Antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, anti-kanserojenik ve glikoz seviyesini düşürücü etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Borges vd., 2019). Biberiye yapraklarından hazırlanan infüzyon Bozyazı/Mersin’de halk arasında migren ağrılarını geçirmek için 3-6 hafta boyunca günde 3 çay bardağı olarak tüketildiği bilinmektedir (Sargın, 2015). Avrupa’da halk arasında yaşlılığa bağlı SSS hastalıkları için konsantrasyonu ve hafızayı geliştirmek için, dolaşım uyarıcısı olarak kullanılmaktadır, ayrıca bellek problemleri için aromaterapistler tarafından önerilmektedir. Güney Amerika’da ise dolaşım bozuklukları, hipertansiyon, sinirsel kaynaklı ağrılar, hazımsızlık, nevroz, yorgunluk ve yaşlılığın genel belirtileri için kullanılmaktadır. Ekvator geleneksel tıbbında, yaşlılığın, halsizliğin ve yorgunluğun genel semptomları için, Alzheimer hastalığı ve bunama ile bağlantılı olarak kullanılmaktadır. Eski Yunanlıların, hafızayı iyileştirmek için bu uçucu yağı belleğin uyarıcısı olarak değerlendirilmekte olduğu kayıtlarda mevcuttur (Adams vd., 2007). Yapılan çalışmalarda, biberiye uçucu yağının sinir sistemini uyarıcı etkisinin, hafıza ve konsantrasyon yeteneklerini geliştirme özelliğinin olduğu gösterilmiştir (Faixova ve Faix, 2008). Bir çalışmada biberiye uçucu yağını inhale eden 20 sağlıklı gönüllü ile yapılan bir çalışmada, aromaterapi uygulamasından sonra kan basıncında, kalp atım hızında ve solunum hızında belirgin bir artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, elektroensefalogram ölçümleri, biberiye uçucu yağının beyin dalgası aktivitesi üzerindeki uyarıcı etkilerinin oluşunu da göstermiştir (Filipstova vd., 2018). Başka bir çalışmada, 1 saatlik bir süre boyunca 0,5 mL biberiye yağına maruz bırakılan farelerin lokomotor aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Kovar vd., 1987). Sayorwan ve diğerlerinin (2013) yapmış olduğu çalışmada ise biberiye yağının (%10 h/h) inhalasyonunun pozitif uyarıcı etkileri ortaya konmuştur. Başka bir çalışmada, biberiye uçucu yağı; 1,8-sineol ve  $\alpha$ -pinen ile sinerjik etkileşim yoluyla asetil kolinesterazı orta düzeyde inhibe etmiş olduğu gösterilmiştir (Dobetsberger ve Buchbauer, 2011). Yapılan başka bir çalışmada, biberiye yağının, insanlarda bellek kalitesi ve ikincil bellek faktörlerinde belirgin bir artış sağladığı belirlenmiştir. Sonuçta, biberiye uçucu yağı, sempatik sinir sistemini harekete geçirme faaliyetine sahiptir, bu da uyanıklık, dikkat ve konsantrasyon yeteneklerini arttırmaktadır. Biberiye uçucu yağının ana bileşeni olan 1,8-sineol inhalasyonu solunum hızını

arttırmıştır. Ayrıca, başka bir çalışmada, biberiye yağının bileşenlerinden biri olan kafurun, SSS, solunum ve dolaşım aktivitesini harekete geçirdiği bildirilmiştir (Hongratanaworakit, 2009).



**Görsel 1.1.** *Biberiye (Rosmarinus officinalis L.) çiçekli dalları ve toprak üstü kısımları.*

Biberiye uçucu yağı ve içerdiği monoterpen bileşenler; AchE üzerindeki etkileri açısından araştırılmış ve zayıf inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Gomes vd., 2009). Yapılan bir çalışmada, *R. officinalis*'in metanol ekstresi *in vitro* kolinesteraz inhibitör aktivitesi göstermiştir. Biberiye uçucu yağının da bileşiminde bulunan 1,8-sineol %44,42 ve  $\alpha$ -pinen %12,57 oranında *in vitro* kolinesteraz inhibisyonu göstermiştir. Bunun yanında, biberiye'nin içerdiği fenolik bir bileşik olan rosmarinik asit, AchE'ye karşı %85,8 inhibitör aktivitesi göstermiştir (Natarajan vd., 2013).

#### **1.11.2.2. *Coriandrum sativum* L.**

*Coriandrum sativum* L. (Kısnış, Apicaceae) meyveleri (Görsel 1.2) geleneksel olarak karminatif, diyaforetik, diüretik ve uyarıcı etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Kısnışın, sedatif-hipnotik, antidiyabetik, hipolipidemik ve hepatoprotektif özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Kısnış tohumları antik çağlarda Mısır medeniyetinde ikinci Ramses'in mezarında bulunmuştur. Mısırlılar bu otu "mutluluk baharatı" olarak tanımlamışlardır. Yunan tıbbında ise Hipokrat (M.Ö. 460-377) tarafından kullanıldığı kayıtlarda mevcuttur (Grieve, 1971). Kelkit (Gümüşhane) aktarlarından elde edilen bilgiye göre kısnış tohumları macun haline getirilerek depresyon hallerinde yenmektedir (Korkmaz ve Karakurt, 2014). Avrupa'da şekerle kaplı kısnış tohumları hafızayı güçlendirmek ve rahatça uykuya dalmak için kullanılmaktadır (Adams vd. 2007). Kısnış

ekstrelerinin hafıza arttırıcı etkiye olumlu katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mani ve Parle, 2009; Dobetsberger ve Buchbauer, 2011).



**Görsel 1.2.** Kışniş (*Coriandrum sativum* L.) meyveleri.

Kışniş tohumlarından elde edilen uçucu yağın temel bileşenleri arasında linalol,  $\alpha$ -pinen, *p*-simen, kafur ve geranil asetat vardır (Mandal ve Mandal, 2015). Linalolün intraperitonal uygulamasının veya inhalasyonunun yatıştırıcı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kuroda vd., 2005; de Moura Linck vd., 2009). Linalol, hipnotik ve antikonvülzan özellikleri de dahil olmak üzere SSS’nde belirgin etkilere sahiptir. Linalol’ün insan deneklerde anksiyolitik ve sedatif etkileri gösterilmiştir (Emamghoreishi vd., 2005). Bir çalışmada kışniş uçucu yağının civcivler üzerinde diazepam ile benzer etkilere sedatif etkili olduğu bulunmuştur (Gastón vd., 2016).

#### **1.11.2.3. *Sesamum indicum* L.**

Susam (*Sesamum indicum* Linn., Pedaliaceae), zengin bir protein kaynağıdır ve dünyanın önemli baharat ve yağ bitkilerinden biridir (Görsel 1.3). Susam yağı, *S. indicum* tohumlarından soğuk sıkım veya endüstriyel olarak çözücü ekstraksiyonu yöntemleri ile elde edilmektedir. Temel olarak antioksidan özellikte oleik ve linoleik yağ asitlerini, aynı zamanda kolesterol düşürücü ve yüksek tansiyonu engelleyen sesamol, sesamin ve sesamolin maddelerini içermektedir. Susam yağı müshil, yumuşatıcı ve yatıştırıcı özelliklere sahiptir bununla birlikte antioksidan ve antibakteriyel etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir (Anilakumar vd., 2010; Mili vd. 2021).

Susam yağının, nazal mukozadaki kuruluğu gidermesi ve E vitamini içeriğinin yüksek olması sayesinde anti-enflamatuvar etki göstermesi (Johnson vd., 2011)

nedenleriyle Avrupa ülkelerinde nazal sprey (Nozoil® Nasal Sprey) formülasyonlarında kullanılmaktadır. Susam yağı, ayrıca çeşitli kullanım şekilleriyle farmasötik teknolojide ve galenik formülasyonlarda yer almaktadır (Güven, 2012).

Susam yağının da ana bileşeni olan oleik asit; 18 karbonlu ve tekli doymamışlık içeren bir yağ asididir. Oleik asit, nanoemülsiyon formülasyonlarının elde edilmesinde yağ fazı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Dixit vd., 2008; Zhao vd., 2013; Mili vd. 2021).



**Görsel 1.3.** *Susam (Sesamum indicum L.) tohumları.*

## 2. YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Kimyasallar

|                                                    |                                          |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Etanol (Merck)                                     | DMSO (Merck)                             |
| Metanol (Merck)                                    | <i>n</i> -Hegzan (Sigma Aldrich)         |
| Nordihidroguairatik asit (Aldrich)                 | Tween 20 (Sigma)                         |
| Span 80 (Merck)                                    | Linoleik asit (Sigma)                    |
| Askorbik asit (Sigma)                              | Lipoksijenaz (Fluka)                     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fluka)           | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka) |
| Donepezil (Sigma)                                  | NaOH (Merck)                             |
| Bütirül kolinesteraz (Sigma)                       | Asetil kolinesteraz (Sigma)              |
| Asetiltiyokolin (ATC, Fluka)                       | Galantamin (Sigma)                       |
| Bütiriltiyokolin (BTC, Fluka)                      | Takrin (Sigma)                           |
| 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH, Aldrich)       | HCl (Merck)                              |
| BF <sub>3</sub> (Boron triflorid) (Merck)          | Helyum (Merck)                           |
| Metilen mavisi (Sigma-Aldrich)                     | Sudan kırmızısı (Sigma-Aldrich)          |
| 5,5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB, Sigma) |                                          |

### 2.2. Kullanılan Cihazlar

|                                                                |                           |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Hassas terazi (Radwag, UK)                                     | Vorteks (Ika Genius 3)    |
| Peristaltik pompa (Cleaver Scientific, UK)                     | Viskozimetre (Brookfield) |
| Çoklu manyetik karıştırıcı (Ika® Werke)                        |                           |
| Mikroplaka okuyucu (BioTek Synergy H1)                         |                           |
| Mikroplaka okuyucu (BioTek PowerWave XS)                       |                           |
| Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK)                    |                           |
| pH metre (Heidolph, Germany)                                   |                           |
| Mikrosantrifüj (Labnet 24D)                                    |                           |
| Ultra Derin Dondurucu, (New Brunswick Scientific)              |                           |
| Gaz-Kromatografisi/Kütle Spektrometresi, (Agilent 5975 GC/MSD) |                           |
| Otomatik ve multikanal pipetör seti, (Brand ve Eppendorf)      |                           |
| UV-visible spektrofotometre (Shimadzu, UV-PharmaSpec 1700)     |                           |
| Refraktometre (Krüss, Germany)                                 |                           |
| Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM, Hitachi HT 7800)           |                           |

### 2.3. Emülsiyonların Elde Edilmesinde Kullanılan Yağlar

Farmakope kalitesinde *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) (Caelo) ve *Coriandrum sativum* (Kıyış) (Frey&Lau) uçucu yağları ticari kaynaklardan temin edilerek kaliteleri GK-AİD ve GK/KS yöntemleriyle doğrulanmıştır. Bu uçucu yağların Avrupa Farmakopesi verileri EK 1’de verilmiştir. Uçucu yağların yanında oleik asit (>%99, TCI-Tokyo Chemical Industry) ve *Sesami oleum* (Susam yağı) (Sigma Aldrich) da emülsiyonların elde edilmesinde denenmiştir.

### 2.4. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Analizi

#### 2.4.1. Gaz kromatografisi (GK)/Alev iyonizasyon dedektörü (AİD)

Fitokimyasal bileşenlerinin rölatif yüzdesi GK ile belirlenmiştir. Bu amaçla Agilent 6890N GK sistemi, HP-Innowax (60 m x 0,25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır. Çalışmada enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C’dir ve 300°C’de AİD kullanılmıştır (Demirci vd., 2018).

#### 2.4.2. Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi (GK/KS)

Uçucu bileşenlerin kütle spektrumlarının belirlenmesi için GK/KS kullanılmıştır. Çalışmada, Agilent 5975 GK/KS sistemi, HP-Innowax (60 m x 0,25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı ise 250°C’dir. 70 eV elektron enerjisi ile 35-450 m/z kütle aralığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. 60°C’de 10 dk, 4°C/dk artışla 220°C’ye, 22 °C’de 10 dk, 1°C /dk artışla 240°C’ye yükselen toplam 80 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” ve Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 3.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılmıştır (Demirci vd., 2018; McLafferty ve Stauffer, 1989; Hochmuth, 2008).

#### 2.4.3. Susam yağının metillenmesi

Susam yağının içerdiği yağ asitlerinin metil esteri formunda GK ve GK/KS ile analiz edilebilmesi için metilleme işlemi yapılmıştır. Bunun için öncelikle 0,20 g sabit yağ 250 mL’lik balona tartılmış ve üzerine 5 mL 0,5 N metanollü NaOH ilave edilmiştir. İçerisine kaynama taşı atılarak 10 dakika boyunca kaynatılmıştır. Kaynama bittikten

sonra balon alınarak üzerine 5 mL boron triflorid (BF<sub>3</sub>) / MeOH ilave edilerek 2 dakika daha kaynatılmıştır. Daha sonra üzerine 5 mL *n*-hekzan ilave edilerek 1 dakika daha kaynatılmıştır. Kaynama bittikten sonra balon soğutulup içerisindeki karışım 25 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Doymuş tuz çözeltisinden balona azar azar ilave edilerek 25 mL'ye tamamlanmıştır. Balon jojenin ağzı kapatılarak 15 kez ters düz edilip işlem sonunda faz ayrımının gerçekleşmesi beklenmiş ve en üstteki faz alınarak GK ve GK-KS analizleri yapılmıştır (Azcan vd., 2004).

## 2.5. Yağların Çözünürlüğü

Emülsiyonların elde edilmesinden önce; biberiye ve kişniş uçucu yağları, susam yağı ve oleik asitin sürfaktan maddeler (Tween 20 ve Span 80) içindeki çözünürlüğü denenmiştir. Bunun için sürfaktan madde ile yağ oranları 9:1, 8:2 ve 7:3 (a:a) olacak şekilde birleştirilmiştir. 48 saat oda sıcaklığında bekletilen yağ-sürfaktan madde karışımları faz ayrımı olup olmaması açısından incelenmiştir.

Emülsiyonların hazırlanmasında su fazı olarak ve analizler öncesindeki seyreltme işlemlerinde 0,1 M ve pH 6.0 sodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) tamponu kullanılmıştır.

## 2.6. Emülsiyonların Su Titrasyonu Yöntemi ile Elde Edilmesi

Yağların emülsiyonlarının hazırlanması için kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi olan “su titrasyonu yöntemi” kullanılmıştır (McClements ve Dungan 1993). Yağ:sürfaktan oranları 1:9, 2:8 ve 3:7 (a:a) olacak şekilde Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3'te verilen miktarlarda tartılmıştır. Sonuçta elde edilen Görsel 2.1'deki karışımlar çoklu manyetik karıştırıcı üzerinde 1 cm boyutunda manyetik balık kullanılarak 15 dk 840 rpm'de karıştırılmıştır. Karıştırma devam ederken su fazı olarak kullanılan sodyum fosfat tamponu (pH: 6.0) peristaltik pompa ile dakikada 0,8 mL karışımlar üzerine damlatılmıştır. 1'den 10'a kadar numaralandırılan formülasyonlara sırasıyla 0-15-30-45-60-75-90-105-120 ve 135 sn su fazı eklenmiştir. Su fazının eklenmesinden sonra 30 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir. Yoğunlaşan ve jel halinde olan formülasyonlar vaktekslenerek karıştırma işlemine katkı sağlanmıştır. Kapakları kapatılarak 48 saat oda sıcaklığında (~25°C) bekletilen formülasyonların görüşlerindeki değişiklikler kaydedilmiştir.

**Tablo 2.1.** 1:9 (a:a) oranında yağ:süpfaktan içeren emülsiyonlardaki yağ, süpfaktan ve su miktarları.

| Yağ:süpfaktan (1:9) | Süpfaktan (mg) | %  | Yağ (mg) | %  | Su (mg) | %  |
|---------------------|----------------|----|----------|----|---------|----|
| 1                   | 1.8            | 90 | 0.2      | 10 | 0       | 0  |
| 2                   | 1.62           | 81 | 0.18     | 9  | 0.2     | 10 |
| 3                   | 1.44           | 72 | 0.16     | 8  | 0.4     | 20 |
| 4                   | 1.26           | 63 | 0.14     | 7  | 0.6     | 30 |
| 5                   | 1.08           | 54 | 0.12     | 6  | 0.8     | 40 |
| 6                   | 0.90           | 45 | 0.10     | 5  | 1.0     | 50 |
| 7                   | 0.72           | 36 | 0.08     | 4  | 1.2     | 60 |
| 8                   | 0.54           | 27 | 0.06     | 3  | 1.4     | 70 |
| 9                   | 0.36           | 18 | 0.04     | 2  | 1.6     | 80 |
| 10                  | 0.18           | 9  | 0.02     | 1  | 1.8     | 90 |

**Tablo 2.2.** 2:8 (a:a) oranında yağ:süpfaktan içeren emülsiyonlardaki yağ, süpfaktan ve su miktarları.

| Yağ:süpfaktan (2:8) | Süpfaktan (mg) | %  | Yağ (mg) | %  | Su (mg) | %  |
|---------------------|----------------|----|----------|----|---------|----|
| 1                   | 1.60           | 80 | 0.4      | 20 | 0       | 0  |
| 2                   | 1.44           | 72 | 0.36     | 18 | 0.2     | 10 |
| 3                   | 1.28           | 64 | 0.32     | 16 | 0.4     | 20 |
| 4                   | 1.12           | 56 | 0.28     | 14 | 0.6     | 30 |
| 5                   | 0.96           | 48 | 0.24     | 12 | 0.8     | 40 |
| 6                   | 0.80           | 40 | 0.20     | 10 | 1.0     | 50 |
| 7                   | 0.64           | 32 | 0.16     | 8  | 1.2     | 60 |
| 8                   | 0.48           | 24 | 0.12     | 6  | 1.4     | 70 |
| 9                   | 0.32           | 16 | 0.08     | 4  | 1.6     | 80 |
| 10                  | 0.16           | 8  | 0.04     | 2  | 1.8     | 90 |

**Tablo 2.3.** 3:7 (a:a) oranında yağ:süpfaktan içeren emülsiyonlardaki yağ, süpfaktan ve su miktarları.

| Yağ:süpfaktan (3:7) | Süpfaktan (mg) | %  | Yağ (mg) | %  | Su (mg) | %  |
|---------------------|----------------|----|----------|----|---------|----|
| 1                   | 1.40           | 70 | 0.6      | 30 | 0       | 0  |
| 2                   | 1.26           | 63 | 0.54     | 27 | 0.2     | 10 |
| 3                   | 1.12           | 56 | 0.48     | 24 | 0.4     | 20 |
| 4                   | 0.98           | 49 | 0.42     | 21 | 0.6     | 30 |
| 5                   | 0.84           | 42 | 0.36     | 18 | 0.8     | 40 |
| 6                   | 0.70           | 35 | 0.30     | 15 | 1.0     | 50 |
| 7                   | 0.56           | 28 | 0.24     | 12 | 1.2     | 60 |
| 8                   | 0.42           | 21 | 0.18     | 9  | 1.4     | 70 |
| 9                   | 0.28           | 14 | 0.12     | 6  | 1.6     | 80 |
| 10                  | 0.14           | 7  | 0.06     | 3  | 1.8     | 90 |

## 2.7. Hızlandırılmış Stabillite Çalışmaları

### 2.7.1. Emülsiyonların santrifüj edilmesi

48 saat oda sıcaklığında değişmeden kalan şeffaf emülsiyonlar 3500 rpm’de 30 dk santrifüjlenerek mekanik dayanıklılıkları kaydedilmiştir. Bu şekilde, emülsiyonların santrifüj sonrasında faz ayrımı ve kremalaşma gözlenmeyen stabil emülsiyonlar termodinamik stabillite çalışmaları kapsamında dondurma-çözdürme ve ısıtma-soğutma testleri uygulanmıştır (Sugumar vd., 2014-1; Badawy vd., 2018).

Santrifüjleme testinden geçen emülsiyonlar sodyum fosfat tamponu ile 1/100 (h/h) seyreltilerek görünüşlerindeki değişiklikler kaydedilmiştir. Daha sonra stabil emülsiyonların bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ, zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Hızlandırılmış stabilite testlerinden geçen emülsiyonların da 1/100 (h/h) seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak aynı şekilde morfolojik analizleri yapılarak bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ, zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür.

### **2.7.2. Dondurma-çözdürme stabilitesi**

Bu test, nanoemülsiyon formülasyonlarının hızlandırılmış stabilitesinin belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Santrifüjleme aşamasından geçen formülasyonlar, -18°C ve 25°C’de her sıcaklıkta en az 48 saat olacak şekilde ve sırasıyla 2 döngü bekletilmiştir. Bu aşamayı herhangi bir değişiklik olmadan geçen formülasyonlar ısıtma-soğutma testi uygulanmıştır (Sugumar vd., 2014-1; Badawy vd., 2018).

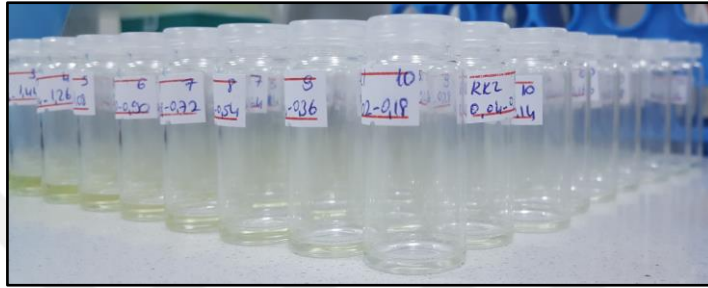
### **2.7.3. Isıtma-soğutma stabilitesi**

Dondurma-çözdürme aşamasını geçen stabil emülsiyon formülasyonları öncelikle 30 dk 40°C’deki su banyosunda bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelen emülsiyonlar 4°C’de en az 48 saat bekletilmiştir. Emülsiyonlar bu şekilde 40°C ve 4°C’de 2 döngü bekletilmiştir. Isıtma-soğutma testinden de geçen emülsiyon formülasyonlarının bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür (Sugumar vd., 2014-1; Badawy vd., 2018).

## **2.8. Emülsiyonların Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.8.1. Emülsiyonların dış görünüşleri**

48 saat oda sıcaklığında bekletilen formülasyonlar faz ayrımı, kremalaşma ve bulanıklık olup olmaması açısından değerlendirilmiştir. Değişiklik gözlenmeyen şeffaf emülsiyonlara bir sonraki aşama olan santrifüjleme ile mekanik dayanıklılık testi yapılmıştır. Görsel 2.1’de yağ:sürfaktan karışımlarının karıştırma öncesi görüntüleri ve Görsel 2.2’de emülsiyonların görünüşleri verilmiştir.



**Görsel 2.1.** Yağ:sürfaktan karışımlarının formülasyon öncesi görüntüleri.



**Görsel 2.2.** Yağ damlacığı boyutu ve konsantrasyonu ile emülsiyon görünümünün değişimi (sodan sağa doğru; şeffaf, yarı şeffaf, bulanık ve süt görünümlü emülsiyon).

### 2.8.2. Emülsiyonların bulanıklık analizi

Emülsiyonlar 1/100 seyreltilerek 600 nm’de köre karşı (tampon çözelti) UV-visible spektrofotometre kullanılarak bulanıklık özellikleri ölçülmüştür. Seyreltildiğinde şeffaflık özelliği değişen emülsiyonların damlacık boyutları da değişime uğradığı bilindiği için bu formülasyonlarla çalışmaya devam edilmemiştir (McClements ve Rao, 2011; McClements ve Dungan, 1993; Prince, 1977).

### **2.8.3. Emülsiyon tipinin belirlenmesi**

Emülsiyon tipi (Y/S veya S/Y), yağda çözünür bir boya (Sudan Kırmızısı) ve suda çözünür bir boya (Metilen Mavisi) kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için emülsiyon numunelerine iki damla Sudan Kırmızısı veya Metilen Mavisi damlatılmıştır (Zhao vd., 2020).

### **2.8.4. Reolojik analiz (Viskozite ölçümü)**

Stabil olduğu tespit edilen emülsiyonların viskoziteleri oda sıcaklığında (25°C) belirlenmiştir. Reolojik analiz için Brookfield koni-tabla reometresi kullanılmıştır. Koninin açısı 1,565° ve çapı 1,2 cm'dir. Sonuçlar Tablo 3.5'te verilmiştir.

### **2.8.5. Damlacık boyutu ve polidispersite indeksinin belirlenmesi**

Emülsiyonların ortalama damlacık boyutu ve PDI, dinamik ışık saçılımı tekniği ile Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) sistemi kullanılarak belirlenmiştir (McClements ve Dungan, 1993; Sugumar vd., 2014-1). Emülsiyonların kırılma indisleri refraktometre (Krüss, Germany) ile ölçülerek damlacık boyutu belirlenmesinde kullanılmıştır. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Zeta boyut analizlerinin spektrumları EK 3'te verilmiştir.

### **2.8.6. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi**

Hızlandırılmış stabilite testleri sonucunda stabil olduğu belirlenen kişniş uçucu yağı nanoemülsiyonunun morfolojisi, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile belirlenmiştir. Bunun için, nanoemülsiyon, distile su ile uygun şekilde seyreltildikten sonra karbon kaplı bakır ızgara üzerine adsorbe edilmiştir. Nanoemülsiyon morfolojisi, 100 kV'lık bir voltajda TEM kullanılarak incelenerek fotoğraflanmıştır. Kişniş uçucu yağı içeren K2-4 formülasyonundaki damlacıkların görüntüleri Görsel 3.16'da verilmiştir.

## 2.9. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

### 2.9.1. *İn vitro* anti-enflamatuvar aktivitenin belirlenmesi: 5-Lipoksijenaz (LOX) enzim aktivitesi inhibisyonu

Lipoksijenaz (1.13.11.12, Tip I-B, 7,9 Unite/mg) enzim aktivitesi inhibisyon düzeylerinin belirlenmesi 96 kuyucuklu kuartz plakada spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir (Tappel, 1962; Baylac ve Racine, 2003). 1,94 mL potasyum fosfat tamponu (100 mM; pH: 8,80), 40 µL, 10 mg/mL konsantrasyondaki test maddeleri ve 20 µL lipoksijenaz enzimi karıştırılarak 25°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu karışımın 300 µL’si her kuyucuğa eklenmiştir. Ardından 7,5 µL substrat (linoleik asit) ilave edilerek 20 sn çalkalanmıştır. 10 dakikadaki absorbans değişimi 234 nm’de ölçülmüştür. Denemeler 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 3.6’da yüzde (%) inhibisyon olarak verilmiştir. Nordihidroguairatik asit (NDGA) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (E - S) / E \times 100 \quad (2.1)$$

E: numunenin eklenmediği enzim absorbansı

S: numunenin eklendiği enzim absorbansı

### 2.9.2. *İn vitro* antikolinesteraz aktivitenin belirlenmesi: Asetilkolinesteraz-AchE ve butirilkinesteraz-BchE inhibisyonu

AChE (Tip-VI-S, EC 3.1.1.7) ve BChE (EC 3.1.1.8) enzim aktivitesindeki inhibisyonun belirlenmesi Elmann ve diğerlerinin (1961) yöntemine göre yapılmıştır (Ellman vd. 1961). Test işlemine başlamadan önce bütün çözeltiler 25°C’ye getirilmiştir. Bunun için 140 µL fosfat tamponu (pH: 8,0, 0,1 M), 20 µL konsantrasyonu ayarlanmış numuneler ve 20 µL enzim çözeltisi (%1’lik jelatine hazırlanmış AchE/BchE) 96 kuyucuklu plaklarda hazırlanmıştır. Birinci test çözeltisi; 70 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim çözeltisi (2,5 U/mL) ve 20 µL DTNB (5,5’-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi (0,01 M), ikinci çözelti ise; 70 µL fosfat tamponu ve 10 µL asetiltiyokolin/bütiriltiyokolin (ATC/BTC) çözeltisi (0,075 M) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Öncelikle birinci test çözeltisi ve farklı konsantrasyonlardaki inhibitör bileşiği çözeltileri kuyucuklara eklenmiştir. 5 dk karışmaları sağlanarak 25°C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda ikinci test çözeltisi her bir kuyucuğa 80 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. İkinci test çözeltisi eklendikten sonra 30 sn’lik hızlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Daha sonra 412 nm’de birinci absorbans

okuması gerçekleştirilmiştir. Mikroplakalar, reaksiyonun sürmesi için 5 dk daha karışmaya bırakılmıştır ve bu süre sonunda ise ikinci absorbans okuması yapılmıştır. İki okuma arasındaki absorbans farkları alınarak aşağıdaki formüle göre yüzde (%) inhibisyon oranları hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[\text{Abs.}(\text{Kontrol}) - \text{Abs.}(\text{Kör})] - [\text{Abs.}(\text{Numune}) - \text{Abs.}(\text{Kör})]}{\text{Abs.}(\text{Kontrol}) - \text{Abs.}(\text{Kör})} \times 100 \quad (2.2)$$

Kör: İnhibitör bileşik ve substratın eklenmediği kuyucuk

Kontrol: Sadece inhibitör bileşiğin eklenmediği kuyucuk

Abs.: Absorbans (412 nm)

Numune: İnhibitör madde

Galantamin, takrin ve donepezil standart madde olarak kullanılmıştır. Çalışmalar 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar % inhibisyon olarak Tablo 3.8’de verilmiştir.

### 3. BULGULAR VE YORUM

#### 3.1. Uçucu ve Sabit Yağ Bileşenlerinin Analiz Sonuçları

Bu tez çalışmasında hammadde olarak kullanılan *C. sativum* L. (Kişniş), *R. officinalis* L. (Biberiye) uçucu yağları, *S. indicum* L. (Susam) yağı ve oleik asit ticari kaynaklardan temin edilmiştir. Uçucu yağların doğrudan ve susam yağının metilleme sonrasında uçucu bileşenlerinin analizi ve teyitleri GK-AİD ve GK/KS yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.1. *Coriandrum sativum* (Kişniş) uçucu yağının fitokimyasal bileşenleri

Bu çalışmada kullanılan kişniş uçucu yağında %74,9 oranında linalol tespit edilmiştir. Kişniş uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS ile belirlenen fitokimyasal bileşenlerinin rölatif yüzdesi (%) ve Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen referans değerler Tablo 3.1'de verilmiştir ve karşılaştırılmıştır. Avrupa Farmakopesine göre *C. sativum* L. meyvelerinden uçucu yağ (*Coriandri aetheroleum*) buhar distilasyonu yöntemi ile elde edilmelidir, kişniş uçucu yağı %65-78 aralığında linalol ana bileşeni içermelidir (PhEur9.0). *C. sativum* uçucu yağında koriandrol olarak bilinen (S)-(+)-linalol bulunur. (R)-(-)-linalol odunsu ve lavanta benzeri kokuya sahipken (S)-(+)-linalol tatlı ve çiçeksi benzeri kokuya sahiptir (Sugawara vd., 1998; Oliver, 2003).

Milica ve diğerlerinin (2016) çalışmasında kişniş uçucu yağının kalitesinin genotip ve çevresel koşullara bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Bunun yanında, kişniş meyvesi uçucu yağının ana bileşeninin, %37,65- %79,9 aralığında bir monoterpen alkol olan linalol olduğu tespit edilmiştir. Orav ve diğerlerinin (2011) çalışmasında ise farklı ülkelerden kişniş tohumlarının uçucu yağının verimi ve bileşimi araştırılmış ve Avrupa Farmakopesi standartları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, 17 kişniş uçucu yağının sadece 10 tanesinin Avrupa Farmakopesi'nde istenilen linalol (%65-78) içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da linalol ve diğer bileşenler farmakopedeki değerlerle karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan kişniş uçucu yağının Avrupa Farmakopesi kalitesinde olduğu teyit edilmiştir.

**Tablo 3.1.** *Kişniş uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS sonuçları.*

| RRI           | Bileşen                         | %           | PhEur9.0 referans değerler % |
|---------------|---------------------------------|-------------|------------------------------|
| 1014          | trisiklen                       | e           |                              |
| 1032          | $\alpha$ -pinen                 | 4,6         | 3,0-7,0                      |
| 1076          | kamfen                          | 0,9         |                              |
| 1118          | $\beta$ -pinen                  | 0,3         |                              |
| 1132          | sabinen                         | e           |                              |
| 1174          | mirsen                          | 0,9         |                              |
| 1203          | limonen                         | 2,2         | 1,5-5,0                      |
| 1218          | $\beta$ -felandren              | 0,1         |                              |
| 1255          | $\gamma$ -terpinen              | 4,4         | 1,5-8,0                      |
| 1280          | $p$ -simen                      | 0,8         | 0,5-4,0                      |
| 1290          | terpinolen                      | 0,6         |                              |
| 1532          | kafur                           | 4,5         | 3,0-6,0                      |
| 1553          | <b>linalol</b>                  | <b>74,9</b> | <b>65,0-78,0</b>             |
| 1612          | $\beta$ -karyofilen             | e           |                              |
| 1611          | terpinen-4-ol                   | 0,1         |                              |
|               | <i>trans</i> -pinokarvil asetat | 0,1         |                              |
| 1706          | $\alpha$ -terpineol             | 0,3         | 0,1-1,5                      |
| 1719          | borneol                         | 0,1         |                              |
| 1795          | geranil asetat                  | 3,4         | 0,5-4,0                      |
|               | geraniol                        | 1,6         | 0,5-3,0                      |
| <b>Toplam</b> |                                 | <b>99,8</b> |                              |

e: eser miktarda

### 3.1.2. *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) uçucu yağının fitokimyasal bileşenleri

Bu tez çalışmasında kullanılan *R. officinalis* (biberiye) uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS analiz sonuçları Avrupa Farmakopesi ile karşılaştırılarak Tablo 3.2’de verilmiştir ve bu uçucu yağda %44,1 1,8-sineol, %12,2 kafur, %10  $\alpha$ -pinen ve %7,7  $\beta$ -pinen tespit edilmiştir. Avrupa Farmakopesine göre *R. officinalis* uçucu yağı, bitkinin çiçekli toprak üstü kısımlarından buhar distilasyonu ile elde edilmelidir. Buna göre Fas-Tunus tipi biberiye uçucu yağı %38-55 1,8-sineol, %5-15 kafur, %9-14  $\alpha$ -pinen ve %4-9  $\beta$ -pinen bileşenlerini içermelidir (PhEur9.0).

**Tablo 3.2.** *Biberiye uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS sonuçları.*

| RRI  | Bileşen                          | %           | PhEur9.0 referans değerler % |
|------|----------------------------------|-------------|------------------------------|
| 1014 | trisiklen                        | 0,2         |                              |
| 1032 | <b><math>\alpha</math>-pinen</b> | <b>10,0</b> | <b>9,0-14,0</b>              |
| 1035 | $\alpha$ -tuen                   | 0,4         |                              |
| 1076 | kamfen                           | 4,3         | 2,5-6,0                      |
| 1118 | <b><math>\beta</math>-pinen</b>  | <b>7,7</b>  | <b>4,0-9,0</b>               |
| 1174 | mirsen                           | 1,4         | 1,0-2,0                      |

**Tablo 3.2.** (Devam) Biberiye uçucu yağının GK-AİD ve GK/KS sonuçları

| RRI           | Bileşen             | %           | PhEur9.0 referans değerler % |
|---------------|---------------------|-------------|------------------------------|
| 1176          | $\alpha$ -felandren | e           |                              |
| 1188          | $\alpha$ -terpinen  | 0,3         |                              |
| 1203          | limonen             | 2,2         | 1,5-4,0                      |
| 1213          | <b>1,8-sineol</b>   | <b>44,1</b> | <b>38,0-55,0</b>             |
| 1255          | $\gamma$ -terpinen  | 1,0         |                              |
| 1280          | $p$ -simen          | 1,2         | 0,8-2,5                      |
| 1290          | terpinolen          | 0,3         |                              |
| 1497          | $\alpha$ -kopaen    | 0,2         |                              |
| 1532          | <b>kafur</b>        | <b>12,2</b> | <b>5,0-15,0</b>              |
| 1553          | linalol             | 0,7         |                              |
| 1590          | bornil asetat       | 1,3         | 0,1-1,5                      |
| 1612          | $\beta$ -karyofilen | 4,9         |                              |
| 1611          | terpinen-4-ol       | 0,4         |                              |
|               | $\alpha$ -humulen   | 0,4         |                              |
|               | $\delta$ -terpineol | 0,2         |                              |
| 1704          | $\gamma$ -murolen   | 0,2         |                              |
| 1706          | $\alpha$ -terpineol | 2,3         | 1,0-2,6                      |
| 1719          | borneol             | 3,5         | 1,5-5,0                      |
| 1773          | $\delta$ -kadinen   | 0,2         |                              |
| <b>Toplam</b> |                     | <b>99,6</b> |                              |

e: eser miktarda

Baydar ve diğerlerinin (2009) çalışmasında Haziran-Eylül aylarında hasat edilen biberiye yapraklarının uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri tespit edilmiştir. Buna göre, biberiye uçucu yağının 14 bileşiği tanımlanmıştır ve ana bileşenleri kafur (%14,77-31,12), 1,8-sineol (%7,7-26,18),  $\alpha$ -pinen (%3,53-9,75) ve borneol (5,07-13,03) olarak bulunmuştur. Miraldi ve diğerlerinin (2010) yapmış olduğu çalışmada farklı bölgelerden temin edilen 8 biberiye uçucu yağı izole edilmiştir. Sonuçlara göre, uçucu yağların ana bileşenleri 1,8-sineol (%37,11-60,28) ve kafur (%6,89-27,72) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca,  $\alpha$ - ve  $\beta$ -pinen (%3,25-18,81), limonen ve karyofillen (%0-10,41) miktarlarında önemli değişiklikler olmuştur.

Çalışmamızdaki bileşenler farmakopedeki referans değerlerle karşılaştırıldığında kullanılan biberiye uçucu yağının Avrupa Farmakopesi kalitesine uygun olduğu teyit edilmiştir.

### 3.1.3. *Sesamum indicum* (susam) yağının fitokimyasal bileşenleri

Bu tez çalışmasında kullanılan susam yağının metilleme işleminden sonra kimyasal bileşenleri GK-AİD ve GK/KS yöntemleriyle tespit edilmiştir. Tablo 3.3'te susam

yağının içerdiği bileşenler verilmiştir. Buna göre, susam yağının içerdiği temel bileşenler %41,1 oleik asit ve %42,8 linoleik asit olarak belirlenmiştir.

**Tablo 3.3.** *Susam yağı bileşimi ve literatür ile karşılaştırılması.*

| Bileşen                   | %           | Anilakumar<br>vd., 2010 | Were vd.,<br>2006 | Yermanos<br>vd., 1972 | Xing vd.,<br>2019  |
|---------------------------|-------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|
| Palmitik asit             | 8,2         | 11,7                    | 7,2–9,7           | 8,3-10,9              | 9,58-10,9          |
| Palmitoleik asit          | e           |                         |                   |                       | 0,10-0,18          |
| Stearik asit              | 4,4         | 5,2                     | 3,8–5,6           | 3,4-6                 | 6,41-7,1           |
| Oleik asit                | <b>41,1</b> | <b>41,4</b>             | <b>31,6–42</b>    | <b>32,7-53,9</b>      | <b>35,88-42,83</b> |
| Elaidik asit              | 1,5         |                         |                   |                       |                    |
| Linoleik asit             | <b>42,8</b> | <b>39,4</b>             | <b>42,9–54,0</b>  | <b>39,3-59</b>        | <b>38,70-44,32</b> |
| 11,14-Eikosatrienoik asit | 0,8         |                         |                   |                       |                    |
| Eikosoik asit             | 1,2         |                         |                   |                       | 0,2-0,29           |
| <b>Toplam</b>             | <b>100</b>  |                         |                   |                       |                    |

e: eser miktarda

Kaynaklara göre; susam yağı, palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit olmak üzere dört ana yağ asidi içermektedir. Bileşimde bulunan oleik ve linoleik asit, benzer oranlarda toplam yağ asitlerinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (Pusadkar vd., 2015). Carvalho ve diğerlerinin (2012) çalışmasında, susam yağının elde edilmesi için farklı ekstraksiyon teknikleri (Soxhlet ve Solid-phase extraction, SPE) ve farklı çözücüler kullanılmıştır. Susam yağındaki ana bileşenleri tüm ekstraktelerde oleik ve linoleik asidi olmuştur. Bu çalışmada, farklı organik çözücülerin kullanılmasının, verimi ve yağ asidi bileşimini değiştirdiği gösterilmiştir. Tablo 3.3'te farklı kaynaklı susam yağlarının yağ asidi kompozisyonu bu tezde kullanılan susam yağı ile karşılaştırılmıştır. Buna göre temel bileşenler olan oleik asit ve linoleik asit yüzdeleri literatürde verilen değerlerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

### 3.2. Yağların Sürfaktandaki Çözünürlüğü

Çalışma kapsamında uçucu yağ emülsiyonlarının elde edilmesinde sürfaktan madde olarak öncelikle Tween 20 kullanılmıştır. Susam yağı emülsiyonlarının Tween 20 ile başarısız sonuçlar vermesi nedeniyle 1:1 oranında Tween 20:Span 80 denemeleri yapılmıştır. Çözünürlük denemeleri için yağ ile sürfaktan madde oranları 1:9, 2:8 ve 3:7 olacak şekilde birleştirilmiştir. 48 saat bekletildikten sonra faz ayrımı olup olmaması açısından incelenmiş, elde edilen sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir. Buna göre susam yağı hariç biberiye ve kişniş uçucu yağları ve oleik asit Tween 20'de 1:9, 2:8 ve 3:7

oranlarında çözünmüştür. Susam yağı 1:1 oranındaki Tween 20:Span 80 sürfaktan karışımında 1:9, 2:8 ve 3:7 oranlarında başarılı bir şekilde çözünmüştür.

**Tablo 3.4.** Yağların sürfaktan maddelerdeki oransal çözünürlükleri.

| Yağ           | Tween 20:Span 80 | Yağ:sürfaktan oranları |     |     |
|---------------|------------------|------------------------|-----|-----|
|               |                  | 1:9                    | 2:8 | 3:7 |
| Susam yağı    | 1:0              | -                      | -   | -   |
|               | 1:1              | +                      | +   | +   |
| Biberiye yağı | 1:0              | +                      | +   | +   |
| Kişniş yağı   | 1:0              | +                      | +   | +   |
| Oleik asit    | 1:0              | +                      | +   | +   |

+ Faz ayrımı yok (başarılı).

- Faz ayrımı var (başarısız).

Bu çalışmada nispeten yüksek oranda sürfaktan madde (1:9, 2:8 ve 3:7, a:a olan yağ:sürfaktan) kullanılmıştır. Daha yüksek miktarda sürfaktan madde, daha yüksek türbülansa ve su fazına karşı yüksek afiniteye neden olmaktadır; bu nedenle daha küçük boyutta damlacıklar oluşmaktadır (Chang vd., 2013). Kendiliğinden emülsifikasyon mekanizmasında, nanoemülsiyon oluşumu için organik faz ve su fazı arasında karıştırma sırasında yüksek hız nedeniyle ara yüzeyde türbülans oluşmaktadır (McClements ve Rao, 2011).

Halk arasında SSS hastalıklarında kullanıldığı bilinen biberiye ve kişniş uçucu yağlarının ve karışımlarının nanoemülsiyon formülasyonlarının elde edilmesi bu tez çalışmasının ilk aşamasını oluşturmaktadır. Güncel kaynaklarda biberiye ve kişniş uçucu yağlarının santral sinir sistemi hedefli nanoemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasına ve biyolojik aktivitelerinin test edilmesine bilğimiz dahilinde rastlanmamıştır.

### 3.3. Emülsiyonların Su Titrasyonu Yöntemi ile Elde Edilmesi

Bu tez çalışmasında stabil emülsiyonların elde edilmesi amacıyla yağ ve sürfaktan madde (Tween 20 ve Span 80) 15 dk boyunca 840 rpm’de karıştırılmıştır. Karıştırma devam ederken, su fazı damla damla eklenmiştir ve 30 dk daha karıştırma devam etmiştir. Emülsiyonlaşma sürecindeki karıştırma hızı olarak 600, 840 ve 1080 rpm için ön denemeler yapılmıştır. 600 rpm’de elde edilen yağ ve sürfaktan verimli bir şekilde karıştırılamamıştır. 1080 rpm’de ise emülsiyonlar köpürme göstermiştir, bu nedenle en uygun karıştırma hızı olarak 840 rpm belirlenmiştir.

Literatürdeki benzer çalışmalarda da farklı karıştırma hızlarında emülsiyonlar elde edilmiş ve stabiliteleri açısından değerlendirilmiştir. Genel olarak karıştırma hızının artmasıyla damlacık boyutları küçülmüştür. Ancak, karıştırma hızının çok artması (>1000 rpm) ile stabilite sorunları ve/veya damlacık boyutlarında büyüme meydana gelmiştir. Kendiliğinden emülsiyonlaşma yönteminde ara yüzeydeki türbülansın artması ile daha küçük damlacıklar oluştuğu bildirilmiştir. Ancak, bazı emülsiyonlarda bu artışın yeni oluşan damlacıkların birleşmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Barzegar vd., 2018).

Başka bir çalışmadaki bulgulara göre, intranazal kullanıma yönelik emülsiyonların hazırlanmasında su fazı olarak ve nanoemülsiyonların ölçümler öncesinde seyreltilmelerinde fosfat tamponu (pH 6) kullanılmıştır. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda; nazal formülasyonlar tahrişi önlemek, etkili bir emilim elde etmek ve patojenik bakterilerin büyümesini önlemek için uygun pH değerinde, yani pH: 4,5-6,5'te tutulmalıdır. Aynı şekilde nazal mukozanın ve verilen ilacın pH'ını sabit tutmak için sodyum fosfat, sodyum sitrat tamponları kullanılabileceği belirtilmiştir (Thorat, 2016).

Tez çalışması kapsamında su fazının yağ ve sürfaktan karışımına eklenmesinde dakikada 0,8 mL damlatabilen peristaltik pompa kullanılmıştır. Peristaltik pompa sayesinde homojen damlacıklar elde edilerek, sabit karıştırma ve damlatma hızında emülsiyonlaşma sürecinde standardizasyon sağlanmıştır. Nanoemülsiyon elde edilmesi ile ilgili literatür çalışmalarının çoğunda su titrasyonu; manuel damlalık veya enjektör yardımıyla yapılmıştır. Ancak, damlatma hızı, karıştırma ve sıcaklık vb. faktörlerin nanoemülsiyonların damlacık boyutunda ve stabilitelerinde önemli faktörler olduğu bilinmektedir (Tadros vd., 2004; McClements, 2005). Navayan ve diğerlerinin (2017) çalışmasında uzun süre etkili ve güvenli sinek kovucu etkili okaliptüs uçucu yağı mikroemülsiyonları elde etmeyi hedeflemişlerdir. İlgili çalışmada uçucu yağ (%5, %10 ve %15) Tween 80:Span 20 (1:1) ve kosürfaktan olarak propilen glikol (sürfaktan:kosürfaktan, 1:1 ve 2:1) karıştırılarak su fazı titrasyonu ile faz diyagramı oluşturularak mikroemülsiyonlar elde edilmiştir. Sonuçta oluşan mikroemülsiyonların damlacık boyutları 16-66 nm aralığında ve iyi fiziksel stabilitede oldukları belirlenmiştir. Ancak ilgili çalışmada, su fazının titrasyon hızı ve karıştırma hızı belirtilmemiştir (Navayan vd., 2017).

Bu tez çalışmasında, taşıyıcı yağ olarak susam yağı ve oleik asit farklı yüzdelerde Tween 20 ve Tween20:Span 80 (1:1) kullanılarak denenmiştir. Ancak, santrifüje dayanıklılık testinde çoğu karışım elenerek stabil emülsiyon elde edilememiştir. Sonuç

olarak; formülasyonların nispeten yüksek oranda kişniş uçucu yağı içermesi ve sürfaktan maddenin nanoemülsiyonlaşma sürecinde yağı tam olarak kaplayamaması ve su oranının nispeten yetersiz kalmasının instabiliteye neden olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, taşıyıcı yağ kullanılmadan biberiye ve kişniş uçucu yağı emülsiyonları, Tween 20 ile kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş, sonuçta stabil nanoemülsiyon formülasyonları elde edilmiştir.

Nanoemülsiyonların eldesinde kullanılan “yağ fazı” seçimi birçok çalışmada farklılık göstermektedir. Uçucu yağlar ile yapılan çalışmalarda genellikle taşıyıcı bir yağ kullanılmamıştır. Bazı çalışmalarda ise orta zincirli trigliseritler (Medium chain triglycerides, MCT), oleik asit vb. yağ fazına eklenerek etken bileşenin çözünürlüğünün ve emülsiyonun stabilitesinin artması sağlanmıştır (Chang vd., 2013; Duarte vd., 2015). Kendiliğinden emülsiyonlaşma yönteminde damlacık büyüklüğüne ve stabiliteye etki eden mekanizmalar belirgin olmaması ile birlikte; yağ fazı içeriği ve miktarı, viskozite, sürfaktan türü ve miktarı, su fazı miktarı, karıştırma hızı, arayüzey gerilimi gibi birçok faktörün etki ettiği bilinmektedir (McClements ve Rao, 2011; Gupta vd., 2016).

Bu tez çalışmasında düşük enerjili ve kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi olan su titrasyonu kullanılmıştır. Literatürde uçucu yağların nanoemülsifikasyonunda yüksek enerjili yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Ghosh ve diğerlerinin 2013 yılında yapmış olduğu çalışmada *Cinnamomum zeylanicum* uçucu yağı nanoemülsiyonu ultrasonik emülsifikasyon ile elde edilmiştir. Yayınlanmış çalışmada, %6 yağ, %18 Tween 80 ve %76 su fazı oranlarında ayrıca 30 dk sonikasyon süresinde  $65\pm0,12$  nm damlacık boyutunda (PDİ:  $0,136\pm0,02$ ) stabil nanoemülsiyonlar elde edildiği bildirilmiştir (Ghosh vd., 2013-1). Ghosh ve diğerlerinin (2013-3) başka bir çalışmasında, *Ocimum basilicum* uçucu yağı:Tween 20 1:3 (h:h) oranında kullanılarak ultrasonik emülsifikasyonla 30 nm ve 0,234 PDİ değerinde Y/S nanoemülsiyonu literatürde yer almaktadır. Sugumar ve diğerlerinin (2014-2) yapmış olduğu çalışmada ise okaliptüs uçucu yağı nanoemülsiyonu, yara iyileştirici amaçlı kullanıma uygun formüle edilmiştir. Bunun için %16,66 yağ, %16,66 Tween 80 ve %66,68 su fazı kullanılmıştır ve farklı sonikasyon sürelerinde (0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk) denenerek stabil nanoemülsiyon elde edilmiştir. Başka bir çalışmada (Saranya vd., 2012), okaliptüs uçucu yağı Tween 20 ve etanol kullanılarak yeni formülasyonun antibakteriyel etkisi incelenmek üzere ultrasonikasyon ile elde edilmiştir. 6 farklı yağ:Tween 20:etanol ve su oranları ile hazırlanan emülsiyonlardan %25 oranında yağ, sürfaktan, etanol ve su içeren

formülasyon 20 nm damlacık boyutuyla daha stabil bulunmuştur. Bu formülasyon termodinamik stabilite testlerinde başarılı fiziksel stabilite göstermiştir. Bunun yanında nanoemülsiyon formülasyonu okaliptüs uçucu yağının antibakteriyel etkisinden daha etkili bulunmuştur. İlgili çalışmada, yüksek enerjili bir yöntem olan ultrasonikasyon kullanılmıştır (Saranya vd., 2012). Ancak, ısınma sorunu ve ultrasonikatörün çalışma hızı göz ardı edilmiştir

Karvakrol nanoemülsiyonunun kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi ile formüle edildiği bir çalışmada (Chang vd., 2013); yağ fazı (%10 karvakrol + MCT) ve sürfaktan madde (%10 Tween 80), su fazı (%80 sitrat tamponu) üzerine 2 mL/dk hızda damlatılarak 500 rpm’de karıştırılmıştır. Bu yöntemle, %25 karvakrol ve %75 MCT içeren nanoemülsiyon formülasyonunda nispeten küçük damlacıklar (55 nm) elde edilmiştir. Araştırmacılara göre bu formülasyonlar iyi fiziksel stabilite ve yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir.

Barzegar ve diğerlerinin (2018) yapmış olduğu çalışmada, *Mentha piperita* uçucu yağı nanoemülsiyonları kendiliğinden emülsifikasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Bunun için yağ ve sürfaktan madde 600 rpm’de karıştırılmıştır ve bu karışım su fazının üzerine damla damla ilave edilerek karıştırmaya devam edilmiştir. Bu çalışmada, sürfaktan madde çeşidi ve miktarının, yağ:sürfaktan oranı ve karıştırma hızının damlacık boyutuna olan etkisi incelenmiştir. Tween 20, Tween 40 ve Tween 80 ile hazırlanan emülsiyonların özellikleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta, Tween 80 ile elde edilen nanoemülsiyon en küçük damlacık boyutunda (50 nm) olduğu belirlenmiştir. Yağ:sürfaktan oranı %50’den %175’e artarken damlacık boyutunun azaldığı tespit edilmiştir. %175’den %225’e artan yağ:sürfaktan oranında ise damlacık boyutunda artma belirlenmiştir. Karıştırma hızı 500 rpm’den 900 rpm’e çıkarıldığında damlacık boyutunda azalma olmuştur (Barzegar vd., 2018). Her ne kadar bu çalışmada kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi ile nanoemülsiyon elde edilmişse de yağ ve sürfaktan madde karışımının su fazı üzerine dakikadaki damlatılma hızı belirsizdir.

Bu tez çalışmasında %44,1 oranında 1,8-sineol, %12,2 kafur ve %10  $\alpha$ -pinen içeren biberiye uçucu yağı kullanılmıştır. Bunun yanında yağ:Tween 20:su oranlarının geniş bir aralıkta seçilmesiyle ve su fazı damlatma hızının 0,8 mL/dk olmasıyla daha küçük boyutta damlacıklar içeren nanoemülsiyonlar elde edilebilmiştir. Ayrıca, nanoemülsiyon stabilitesi kapsamında santrifüjleme, ısıtma-soğutma ve dondurma-çözdürme testleri gerçekleştirilerek nanoemülsiyonların hızlandırılmış stabilitesi belirlenmiştir.

hızlandırılmış stabilite testleri ile formülasyonun raf ömrü tahmin edilir veya alternatif formülasyonların göreceli stabilitesi karşılaştırılabilir (Bajaj vd., 2012). Benzer bir şekilde, Duarte ve diğerlerinin (2015) yaptıkları çalışmada ise 1,8-sineol (%44), kafur (%16,1),  $\beta$ -mirsen (%11) ve  $\alpha$ -pinen (%9,4)'i etken madde olarak içeren *R. officinalis* uçucu yağının Y/S nanoemülsiyonu kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi ile elde edilmiştir ve larvisidal aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. İlgili çalışmada, %5 (a/a) uçucu yağ, %5 (a/a) Tween 20 800 rpm'de 30 dk karıştırılmıştır. Karıştırma devam ederken %90 (a/a) su fazı 3,5 mL/dk olacak şekilde yağ fazının üzerine damlatılmıştır ve 60 dk daha karıştırmaya devam edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanan nanoemülsiyon formülasyonu 1, 7, 21 ve 30 gün sonra damlacık boyutları ve stabiliteleri açısından değerlendirilmiştir. Mavimsi bulanıklıkta elde edilen nanoemülsiyon formülasyonunda herhangi bir faz ayrımı veya kremalaşma gözlenmemiştir. 30 gün sonra alınan ölçümlerde 200 nm'nin altında ve düşük PDİ değerinde stabil nanoemülsiyon elde edildiği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmada 1:9, 2:8 ve 3:7 (a:a) olan yağ:sürfaktan oranlarının her birinde su miktarı 200'er  $\mu$ L arttırılarak bu konsantrasyonlarda su fazının etkisi incelenmiştir. Her bir formülasyonun içerdiği yağ, sürfaktan ve su fazı yüzdesi ve yağ konsantrasyonları detaylı olarak "Materyal ve Metot" kısmındaki Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3'te verilmiştir. Formülasyonlardan 1'den 10'a kadar numaralandırılan karışımlardan birincisine su fazı eklenmemiştir. 1. karışım sadece yağ ve Tween 20 içermektedir; bu nedenle, yağın sürfaktan madde içerisindeki çözünürlüğü açısından değerlendirilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi nanoemülsiyon formülasyonlarının elde edilmesinde eklenen su miktarına bağlı olarak damlacık boyutunda, emülsiyon viskozitesinde, stabilitesinde ve görünümünde değişiklikler olabilmektedir (McClements, 2005; Grumezescu, 2016).

Bu çalışmada, formülasyonların hazırlandıklandıktan sonraki görünimleri (akışkan, yoğun, jel, şeffaf ve bulanık) ile ilgili bilgiler kaydedilmiştir. Oda sıcaklığında bekletildikten 48 saat sonra görünümünde değişiklik gözlenmeyen şeffaf emülsiyonlar 3500 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Literatürdeki bilgilere göre, hızlandırılmış stabilite çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen santrifüjleme ile emülsiyonların mekanik dayanıklılıkları kısa sürede belirlenebilmektedir (Chime vd., 2014; Sugumar vd., 2014-1).

Literatürde belirtildiği üzere emülsiyon sistemlerinin bulanıklığı, yağ damlacıklarının boyutuna ve konsantrasyonuna bağlıdır (McClements ve Dungan 1993;

McClements, 2012; Chantrapornchai vd., 1998). Bunun yanında, emülsiyonların optik özellikleri ve görünüşleri, şeffaflık, yarı şeffaflık ve opaklık açısından, emülsiyonların türbiditesini ölçerek; nano- ve mikroemülsiyon veya klasik emülsiyon olup olmadıklarını belirlemek için kullanılabileceğini bildirilmiştir (McClements ve Dungan, 1993; Prince, 1977). Literatürdeki çalışmalarda da termodinamik stabilite kapsamında farklı hızlarda santrifüjleme, dondurma ve ısıtma kullanılmıştır. Bu testler ile emülsiyonların stress koşullarındaki dayanıklılıkları kısa süre içinde test edilebilmektedir. Bazı çalışmalarda ise emülsiyonların kinetik stabilitesi belirli bir süre (3-4 ay) oda sıcaklığında saklanarak belirlenmiştir (Kale ve Deore, 2017).

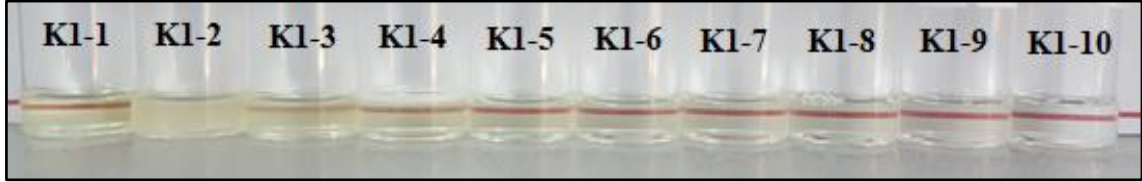
Bu tez çalışmasında,  $PD\dot{I} \leq 0,3$  olan emülsiyonlar stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Bilindiği üzere, polidispersite indeksi, dağılımın kalitesini veya homojenliğini göstermektedir.  $PD\dot{I}$  değerinin 0,2'den küçük olması dar boyut dağılımını ve nispeten daha uzun süreli stabiliteyi göstermektedir ve literatür tarafından desteklenmektedir (Sugumar vd., 2014-1; Kale ve Deore, 2017).

### **3.3.1. *Coriandrum sativum* (Kişniş) uçucu yağı emülsiyonları**

Farmasötik kalitede *C. sativum* uçucu yağı kullanılarak 27 farklı konsantrasyonda emülsiyon elde edilmiştir. 1:9, 2:8 ve 3:8 (a:a) oranlarında kişniş uçucu yağı:Tween 20 “Materyal ve Metot” kısmında verilen Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3’de belirtilen miktarlarda tartılarak karıştırılmıştır.

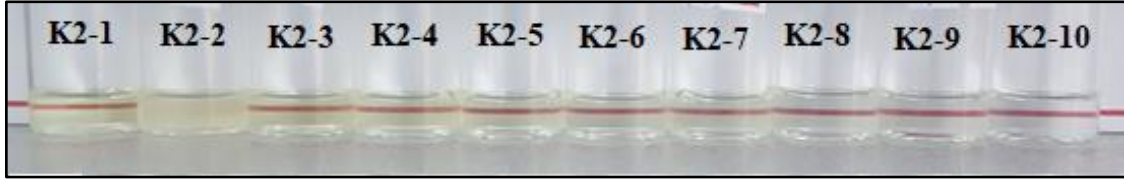
Elde edilen sonuçlara göre, 1:9 (a:a) oranında kişniş uçucu yağı:Tween 20 içeren formülsiyonlarda su fazının artmasıyla emülsiyonların akışkanlığı ve şeffaflığı değişmiştir. K1-2 ve K1-6 arası emülsiyonlar yoğun, K1-7 formülasyonundan sonrası akışkandır. Bunun yanında K1-2 ve K1-3 emülsiyonu bulanık diğerleri şeffaftır (bkz. Görsel 3.1). K1 serisi emülsiyonların santrifüjleme sonrası görünümünde herhangi bir değişiklik (faz ayrımı, kremalaşma vs.) olmamıştır. Bu nedenle bu emülsiyonlar 1/100 seyreltilerek absorban, boyut ve  $PD\dot{I}$  ölçümleri gerçekleştirilmiştir.  $PD\dot{I}$  değerleri 0,3’den küçük olan nanoemülsiyon formülasyonları K1-2, K1-3 ve K1-4 sırasıyla  $11,45 \pm 0,54$  nm,  $95,30 \pm 31,57$  nm ve  $11,32 \pm 1,64$  nm boyutlara ve  $-5,44 \pm 0,17$ ,  $-5,60 \pm 0,495$  ve  $-6,20 \pm 0,346$  zeta potansiyel değerlerine sahiptirler. Bu üç emülsiyona, hızlandırılmış stabilite testleri yapılmış ve faz ayrımı görülmeyen sadece **K1-4** formülasyonu olarak belirlenmiştir. %63 Tween 20, %7 kişniş uçucu yağı ve %30 su fazı içeren K1-4 nanoemülsiyonunun santrifüjleme, ısıtma soğutma ve dondurma çözme testleri

sonrasında ölçülen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyel değeri sırasıyla  $11,93 \pm 0,76$  nm,  $0,322 \pm 0,02$  ve  $-3,26 \pm 0,06$ 'dır. Buna göre K1-4'ün stabilite testlerinden önce ve sonra damlacık boyutunda ve PDİ değerinde bir değişim olmadığı görülmüştür. EK 2'de K1 serisi emülsiyonların ölçüm sonuçları ve EK 3'te zeta boyut analizinin spektrumları verilmiştir.



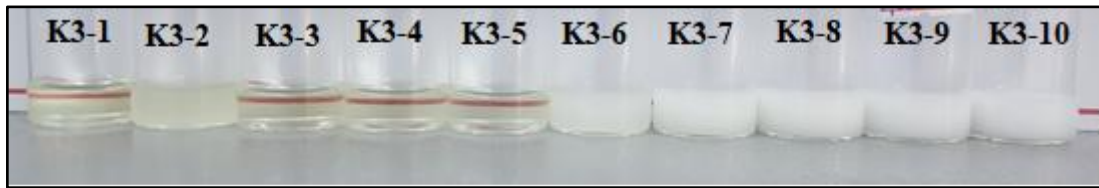
**Görsel 3.1.** *Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (1:9; a:a) içeren K1 serisi emülsiyonların görünimleri.*

Kişniş uçucu yağı ve Tween 20'nin 2:8 (a:a) oranında karıştırılarak emülsiyonlarının elde edilmesi ile elde edilen sonuçlar EK 2'de verilmiştir. Buna göre, K2 serisi emülsiyonlardan sadece K2-2 formülasyonu yoğun ve bulanık görünümdeyken diğerleri akışkan ve şeffaf görünümdeyken (Görsel 3.2). Santrifüjleme sonucunda sadece K2-2'de faz ayrımı gözlenmiştir. PDİ değerleri 0,3'den küçük şeffaf emülsiyonlar (K2-3 ve K2-6 arası) ısıtma-soğutma ve dondurma-çözme testlerine tabi tutulmuştur. Bu testlerin sonucunda faz ayrımı gözlenmeyen emülsiyonların damlacık boyutu ve PDİ değerleri ölçülmüştür. Stabilite testleri öncesi ve sonrasında damlacık boyutu değerleri sırasıyla K2-3 için  $31,67 \pm 9,27$  nm ve  $16,70 \pm 0,20$  nm; K2-4 için  $10,74 \pm 0,23$  nm ve  $11,97 \pm 0,82$  nm; K2-5 için  $11,86 \pm 0,47$  nm ve  $11,18 \pm 0,5685$  nm; K2-6 için  $14,69 \pm 1,69$  nm ve  $18,13 \pm 6,187$  nm olarak kaydedilmiştir. Stabilite testleri sonucunda **K2-4** ve **K2-5** formülasyonu istenilen PDİ ( $\leq 0,3$ ) değerlerindedir. Ancak, K2-3 ve K2-6'da damlacık heterojenliğinin arttığı gözlenmiştir. Stabil kalan nanoemülsiyonlar K2-4 ve K2-5 sırasıyla %14 ve %12 oranında kişniş yağı içermektedir. Bunun yanında, K2-5'in PDİ değeri ( $0,196 \pm 0,030$ ) K2-4'den ( $0,338 \pm 0,045$ ) daha küçük ölçülmüştür. Bu nedenle K2-5 nanoemülsiyon formülasyonunun 2:8 (a:a) oranındaki yağ:süpfaktan madde içeren diğer formülasyonlardan daha stabil ve homojen damlacıklar içerdiği söylenebilir. EK 3'te, zeta boyut analizinin detaylı spektrumları verilmiştir.



**Görsel 3.2.** *Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (2:8; a:a) içeren K2 serisi emülsiyonların görünüşleri.*

3:8 (a:a) oranında kişniş uçucu yağı:Tween 20 içeren K3 serisi emülsiyonların görünüşleri Görsel 3.3'te ve karakterizasyon ve stabilite çalışmaları ile ilgili sonuçlar EK 2'de verilmiştir. Buna göre, K3-2 bulanık, K3-6 - K3-10 arası bulanık ve süt görünümündedir. Bu nedenle bu emülsiyonlar elenerek çalışmalara K3-3, K3-4 ve K3-5 formülasyonları ile devam edilmiştir. 1/100 seyreltilen bu 3 emülsiyondan K3-3'te bulanıklaşma oluşmuştur; yüksek PDİ değerinde ( $0,467 \pm 0,007$ ) olduğu için stabilite testlerinde kullanılmamıştır. K3-4 ve K3-5'in damlacık boyutları ölçülmüştür ve sırasıyla  $14,44 \pm 0,18$  ve  $11,65 \pm 0,50$  nm olarak kaydedilmiştir. Isıtma-soğutma, dondurma çözündürme ve santrifüjleme sonrası damlacık boyutları ise K3-4 için  $120,5 \pm 1,115$  nm ve K3-5 için  $70,47 \pm 1,863$  nm'dir. Damlacık boyutlarının yüksek olmasının yanı sıra nispeten yüksek PDİ değerleri de ölçülmüştür. K3-5'in damlacık boyutu spektrumunda stabilite testleri öncesinde tek-dar pik ve stabilite testleri sonrasında damlacık boyutunun arttığına işaret eden iki ayrı büyük pik gözlenmiştir (EK 3). 3:7 (a:a) oranında yağ:sürfaktan madde içeren K3 serisi emülsiyonlardan stabil emülsiyon formülasyonu elde edilememiştir.



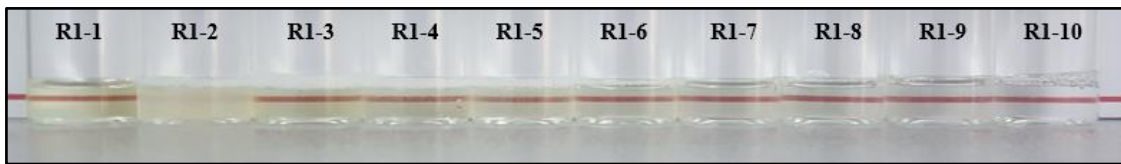
**Görsel 3.3.** *Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) içeren K3 serisi emülsiyonların görünüşleri.*

### 3.3.2. *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) uçucu yağı emülsiyonları

Avrupa Farmakopesi kalitesinde *R. officinalis* uçucu yağı kullanılarak 27 farklı yağ konsantrasyonu içeren emülsiyon elde edilmiştir. 1:9, 2:8 ve 3:8 (a:a) oranlarında biberiye uçucu yağı:Tween 20 “Materyal ve Metot” kısmında verilen Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3'teki

miktarlarda tartılarak manyetik karıştırıcıda 840 rpm'de 15 dk karıştırılmıştır. Karışımlara su fazı eklenerek emülsiyonlaşması sağlanmıştır.

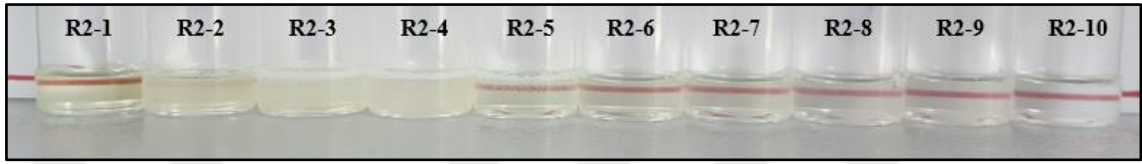
Sonuç olarak, 1:9 (a:a) oranında biberiye uçucu yağı:Tween 20 içeren R1 serisi 10 karışım hazırlanmıştır. Bu karışımlara R1-1 hariç, artan miktarlarda su fazı eklenmiştir. R1 serisi emülsiyonların görünüşleri Görsel 3.4'te verilmiştir. Buna göre, R1-2 emülsiyonunun yarı şeffaf görünümde olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca, R1-2 ve R1-5 arası emülsiyonlar yoğunken diğerleri akışkandır. R1 serisi emülsiyonların santrifüjleme sonrası görüntülerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu nedenle emülsiyonlar 1/100 seyreltilerek karakterizasyon amacıyla absorban, boyut ve PDİ ölçümleri alınmıştır. PDİ değerleri 0,3'den küçük olan nanoemülsiyon formülasyonları R1-2, R1-3 ve R1-5'dir (EK 2). Stabilitate testleri sonrasında, bu formülasyonlardan R1-2'de faz ayrımı gözlenmiştir. R1-5 ise stabilitate testleri sonrasında yüksek PDİ değerinde ( $0,409 \pm 0,085$ ) ölçülmüştür. Sonuçta sadece **R1-3** formülasyonu stabil bulunmuştur. Buna göre %8 biberiye uçucu yağı ve %20 su fazı içeren R1-3 nanoemülsiyon formülasyonunun stabilitate testlerinden önce ve sonra damlacık boyutu sırasıyla  $28,39 \pm 13,30$  ve  $15,05 \pm 0,1986$  nm olarak kaydedilmiştir. R1-3'ün damlacık boyutu spektrumunda beklenildiği gibi stabilitate testleri öncesinde ve sonrasında belirgin farklılıklar olmamıştır (EK 3). Literatürde de belirtildiği gibi emülsiyonlardaki su miktarının artmasıyla spektrumlardaki pik sayısı ve genişliği de genellikle artmaktadır (McClements, 2012).



**Görsel 3.4.** Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (1:9; a:a) içeren R1 serisi emülsiyonların görünüşleri.

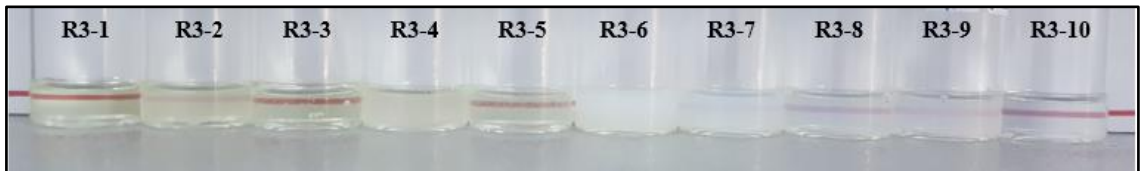
2:8 (a:a) oranında biberiye uçucu yağı:Tween 20 içeren R2 serisi emülsiyonların görünüşleri Görsel 3.5'te verilmiştir. Bu emülsiyonlardan R2-3 ve R2-4 formülasyonu bulanık görünümde iken 24 saat sonra yarı şeffaf hale gelmişlerdir. R2-2 ve R2-5 arası emülsiyonlar yoğun diğerleri akışkandır. 3500 rpm'de 30 dk santrifüjlenen bu emülsiyonlarda değişiklik gözlenmemiştir. PDİ değerleri 0,3 ve daha küçük olan R2-5 ve R2-7 emülsiyonu stabilitate testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta R2-7'de faz ayrımı

gözlenmiştir ve sadece %12 biberiye uçucu yağı içeren **R2-5** nanoemülsiyon formülasyonunun stabil kaldığı belirlenmiştir. Buna göre, R2-5'in stabilite testleri öncesi ve sonrasında damlacık boyutu sırasıyla  $32,17 \pm 18,76$  nm ve  $30,98 \pm 9,69$  nm olarak ölçülmüştür (EK 2). EK 3'te R2 serisinin stabilite testleri öncesi ve sonrasındaki zeta boyut analizinin spektrumları verilmiştir. Buna göre, R2-5'in damlacık boyutu spektrumunda dar bir pikin yanında heterojen ve büyük damlacıkların olduğunu belirten pikler gözlenmiştir.



**Görsel 3.5.** Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (2:8; a:a) içeren R2 serisi emülsiyonların görünüşleri.

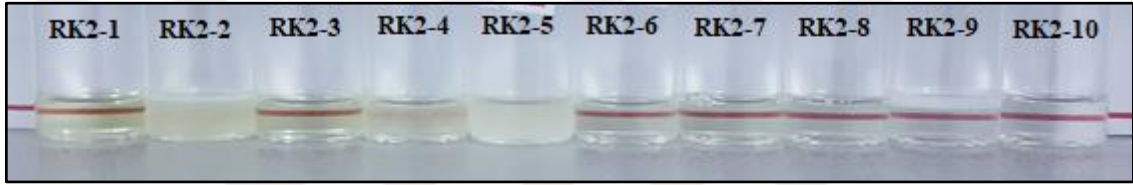
Biberiye uçucu yağı ve Tween 20'nin 3:7 (a:a) oranında karıştırılmasıyla elde edilen emülsiyonlarının görünüşleri Görsel 3.6'da ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları EK 2'de verilmiştir. R3 serisinde biberiye uçucu yağının miktarının artmasıyla görünüşlerinde oluşan bulanıklıkta artmıştır. 24 saat bekletilen emülsiyonlardan bulanık olan R3-4 yarı şeffaf, yarı şeffaf olan R3-7, R3-8 ve R3-9 süt görünümüne gelmişlerdir. Santrifüjlenen emülsiyonlardan R3-2, R3-3 ve R3-5 formülasyonu değişiklik olmadan kalmıştır. Diğerlerinde faz ayrımı ve kremalaşma gözlenmiştir. Damlacık boyutu ve PDİ ölçümleri alınan bu emülsiyonlardan PDİ değeri 0,3'ün altında ölçüm belirlenmemiştir ve stabilite testleri yapılmamıştır. R3 serisi emülsiyonlarının heterojen damlacıklar içerdiği PDİ değerlerinin yanısıra EK 3'te verilen zeta boyut analizi spektrumlarında da görülmektedir.



**Görsel 3.6.** Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) içeren R3 serisi emülsiyonların görünüşleri.

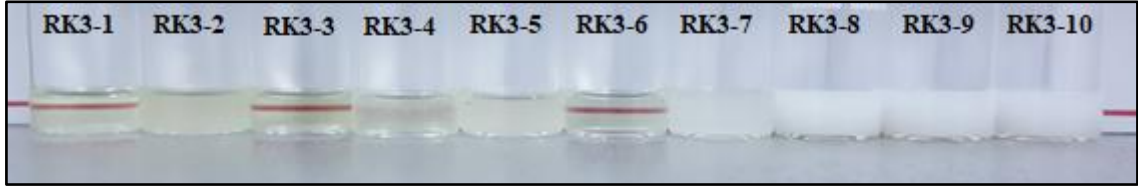


verilmiştir. Bu emülsiyonlardan RK2-2 ve RK2-5 bulanık, RK2-4 yarı şeffaf ve diğerleri şeffaf görünümündedir. RK2-2, RK2-4 ve RK2-5 yoğun kıvamdadır. Bu seri emülsiyonlardan santrifüjleme sonrasında RK2-2’de faz ayrımı gözlenmiştir ve bu formülasyon elenerek diğerlerinin absorbands, boyut ve PDİ değerleri ölçülmüştür (EK 2). PDİ değeri 0,3’ten küçük olan formülasyon sadece RK2-3 ( $0,247 \pm 0,009$ )’tür. Bu emülsiyon ısıtma-soğutma, dondurma-çözdürme ve santrifüjleme testlerine tabi tutulmuştur. Bu testler sonrasında daha yüksek PDİ değeri ( $0,51 \pm 0,029$ ) ölçülmüştür. Damlacık boyutunda ise ilk ölçüme ( $10,48 \pm 0,1572$  nm) göre artma ( $18,92 \pm 2,012$  nm) olduğu belirlenmiştir. Yoğunluğu büyük ve dar pikin yerini çoklu pikler almıştır. EK 3’te damlacık boyutu değişimlerinin spektrumları verilmiştir.



**Görsel 3.8.** Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı:Tween 20 (2:8; a:a) içeren RK2 serisi emülsiyonların görünimleri.

3:7 (a:a) oranında biberiye:kişniş uçucu yağı karışımı: Tween 20 içeren RK3 serisi emülsiyon formülasyonlarının görünimleri Görsel 3.9’da verilmiştir. Buna göre RK3-2, RK3-5, RK3-7 bulanık, RK3-4 yarı şeffaf ve RK3-8, RK3-9 ve RK3-10 süt görünümündedir. 24 saat sonra RK3-2 yarı şeffaf hale gelmiştir. Bu seri emülsiyonlardaki su miktarının artmasıyla makro boyuttaki damlacıkların da arttığı gözlemlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında sadece RK3-2 ve RK3-6 arası emülsiyonlar değişmeden kalmıştır. Absorbans, boyut ve PDİ ölçümleri alınan emülsiyonlardan 0,3’ün altında PDİ değerine sahip olanlar RK3-3 ve RK3-4 olmuştur. Stabilite çalışmaları sonrasında ise homojenliklerinin azalarak yüksek PDİ değerlerinde oldukları ve damlacık boyutlarının arttığı belirlenmiştir. EK 2’de verildiği gibi RK3-3’ün stabilite testleri öncesi ve sonrasında damlacık boyutları sırasıyla  $12,87 \pm 0,395$  nm ve  $26,87 \pm 0,451$  nm ve RK3-4’ün stabilite testleri öncesi ve sonrasında damlacık boyutları sırasıyla  $14,6 \pm 1,73$  nm ve  $28,89 \pm 2,529$  nm olarak ölçülmüştür. Damlacık boyutu spektrumlarında stabilite testleri sonrasında çoklu pikler gözlenmiştir (EK 3).

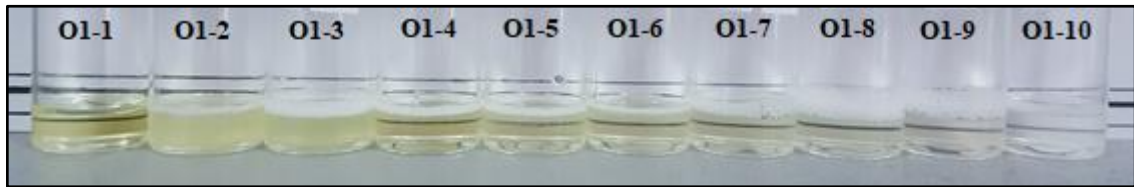


**Görsel 3.9.** Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) içeren RK3 serisi emülsiyonların görünüşleri.

### 3.3.4. Oleik asit emülsiyonları

Bu tez çalışmasında, yağ fazı olarak oleik asit ve sürfaktan madde olarak Tween 20; 1:9, 2:8 ve 3:7 (a:a) oranında kullanılarak emülsiyonlar elde edilmiştir. Her bir yağ:sürfaktan madde oranında ilk formülasyonlar hariç su fazı miktarı artırılarak stabil emülsiyonlar elde edilmeye çalışılmıştır. İlk formülasyonlar yağın sürfaktan madde içindeki çözünürlüğünü gösterdiği için su fazı içermemektedir.

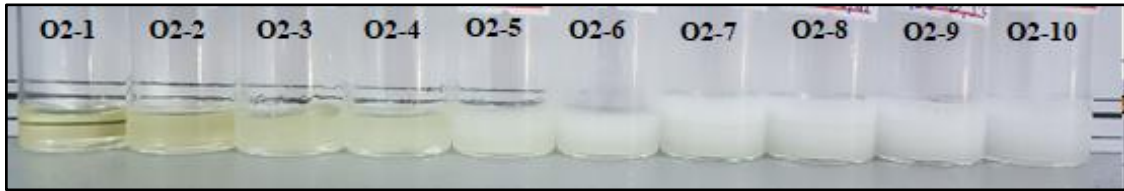
Tez kapsamında gerçekleştirilen 1:9 (a:a) oranında oleik asit:Tween 20 içeren O1 serisi emülsiyon formülasyonlarının görünüşleri Görsel 3.10'da verilmiştir. Buna göre, O1-2 ve O1-3 bulanık görünümdeyken diğerleri şeffaf görünümdeyken. Bunun yanında O1-2 ve O1-6 arası emülsiyonlar yoğun kıvamdadır. O1 serisi emülsiyonlardan santrifüleme sonrası faz ayrımı görülenler O1-2 ve O1-3'tür ve bu formülasyonlar elenerek diğer emülsiyonlar 1/100 seyreltilmiştir ve damlacık boyutu ve PDİ değerleri ölçülen emülsiyonlardan 0,3'ten düşük PDİ değerlerine rastlanmamıştır. Bu emülsiyonların damlacık boyutları ise 23,89 nm - 48,22 nm arasındadır. Dondurma-çözdürme, ısıtma-soğutma ve santrifüjleme testlerine tabi tutulan bu emülsiyonlarda faz ayrımı ve/veya kremalaşma gözlenmiştir. EK 3'teki damlacık boyut spektrumlarında görüldüğü gibi pik genişlikleri daha büyük ve heterojen pikler vardır.



**Görsel 3.10.** Oleik asit:Tween 20 (1:9; a:a) içeren O1 serisi emülsiyonların görünüşleri.

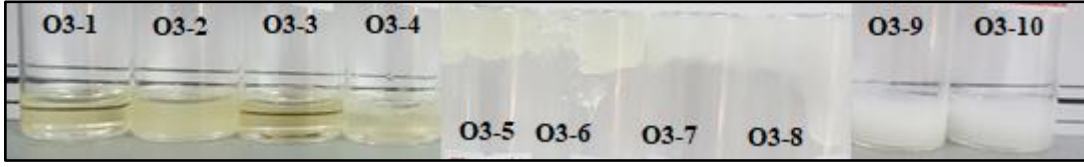
Oleik asit emülsiyonlarının O2 serisinde; 2:8 (a:a) oranında oleik asit:Tween 20 içeren formülasyonlarının görünüşleri Görsel 3.11'de verilmiştir. O2-2, O2-3 ve O2-4

bulanık görünümde ve diğerleri süt görünümündedir. 2:8 yağ:süpfaktan madde oranında şeffaf emülsiyon elde edilememiştir. O2-7 ve O2-10 arası emülsiyonlarda köpürme olmuştur ve birkaç saat bekletme ile kremalaşma gözlenmiştir. Bunların yanında, EK 2’de belirtildiği gibi O2-3 ve O2-6 arası emülsiyon formülasyonları jel kıvamındandır. O2-2 emülsiyonu bekletildiğinde yarı şeffaf hale gelmiştir ve damlacık boyutu ve PDİ değerleri ölçülmüştür. 600 nm’deki absorbands değeri de nispeten yüksek (0,802) olan bu emülsiyonun damlacık boyutu  $156,77 \pm 3,00$  nm ve PDİ değeri  $0,386 \pm 0,019$  olarak ölçülmüştür. EK 3’te verilen damlacık boyut dağılımı spektrumlarına bakıldığında geniş ve heterojen pikler olduğu görülmektedir.



**Görsel 3.11.** Oleik asit:Tween 20 (2:8; a:a) içeren O2 serisi emülsiyonların görünimleri.

Oleik asit ve Tween 20’nin 3:7 (a:a) oranında birleştirilmesiyle elde edilen O3 serisi emülsiyonların görünimleri Görsel 3.12’de verilmiştir. Buna göre O3-2, O3-4, O3-7 ve O3-8 bulanık, O3-3 şeffaf, O3-5 ve O3-6 yarı şeffaf, O3-9 ve O3-10 süt görünümündedir. 24 saat sonra O3-2 ve O3-4 şeffaf hale gelmiştir. Bunların yanında, EK 2’de belirtildiği gibi O3-2 ve O3-4 arası emülsiyonlar yoğun, O3-5 ve O3-8 arası emülsiyonlar jel kıvamındadır. Yalnızca şeffaf olan emülsiyonlar santrifüjlenerek mekanik dayanıklılığı test edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında değişiklik gözlenmediği için O3-2, O3-3 ve O3-4 emülsiyonlarının damlacık boyutları ve PDİ değerleri ölçülmüştür. Ancak, 3 emülsiyon formülasyonunda PDİ değeri 0,3’ten küçük çıkmamıştır. O3-2, O3-3 ve O3-4’ün damlacık boyutları sırasıyla  $194,07 \pm 3,25$  nm,  $219,97 \pm 7,48$  nm ve  $238,87 \pm 4,44$  nm olarak kaydedilmiştir (EK 2). Bu değerler, stabil nanoemülsiyon elde etmek için istediğimiz değerlerin dışındadır. Literatürde belirtildiği gibi, bu emülsiyonlar kısa süreli stabiliteye sahip olsalar da damlacık boyutlarındaki heterojenlikleri nedeniyle uzun süreli stabilite sağlayamazlar (Setya vd., 2014; McClements ve Xiao, 2012; Robins 2000). EK 3’te verilen spektrumlarda damlacık boyut dağılımının heterojen olduğu açıkça görülmektedir.

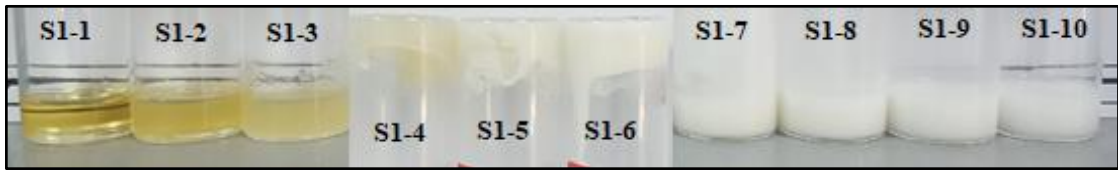


**Görsel 3.12.** Oleik asit:Tween 20 (3:7; a:a) içeren O3 serisi emülsiyonların görünüşleri.

### 3.3.5. Susam yağı emülsiyonları

Bu tez çalışmasında, susam yağının yağ fazı olarak kullanılmasıyla emülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlardan bir tanesidir. Bunun için öncelikle susam yağının Tween 20 içindeki çözünürlüğü denenmiştir. 1:9, 2:8 ve 3:7 (a:a) oranlarında susam yağı Tween 20 ile çözünmemiştir. Bu nedenle, 1:1 (a:a) oranında Tween 20:Span 80 sürfaktan karışımı kullanılarak çözünürlük çalışması tekrarlanmıştır ve 1:9, 2:8 ve 3:7 (a:a) oranlarında yağ:sürfaktan madde karışımında 48 saatlik bekletme sonucunda faz ayrımı gözlenmemiştir. Susam yağı emülsiyonları 1:1 (a:a) oranında Tween 20:Span 80 ile 1:9, 2:8 ve 3:7 (a:a) oranlarında yağ:sürfaktan madde karışımı “Materyal ve Metot” kısmındaki Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3’te verilen miktarlarda tartılarak karıştırılmıştır.

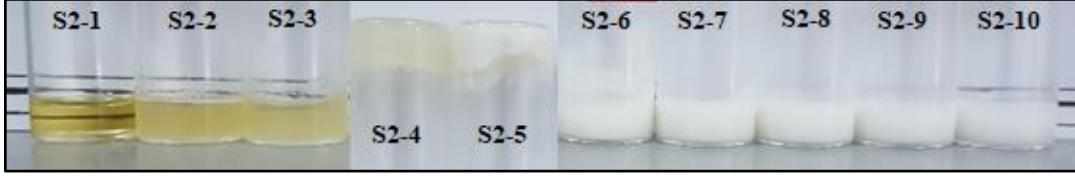
Tez kapsamında; 1:9 (a:a) oranında susam yağı:sürfaktan karışımı kullanılarak hazırlanan S1 serisi emülsiyonların görünüşleri Görsel 3.13’te verilmiştir. Buna göre, S1-2 ve S1-3 yoğun ve bulanık görünümündedir. EK 2’de belirtildiği gibi S1-4, S1-5 ve S1-6 formülasyonu jel ve diğerleri akışkan kıvamdadır. Bu seri emülsiyonlarda şeffaf ve yarı şeffaf görünüm elde edilememiştir. Ayrıca, kısa süreli bekletme ile S1-2, S1-3’te faz ayrımı ve S1-7 ile S1-10 arası emülsiyonlarda kremalaşma gözlenmiştir.



**Görsel 3.13.** 1:9 (a:a) oranında Susam yağı:(Tween 20:Span 80, 1:1) hazırlanan emülsiyonların görünüşleri.

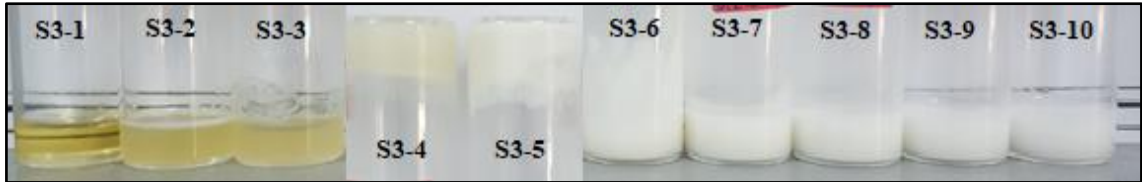
2:8 (a:a) oranında susam yağı ve sürfaktan karışımının birleştirilmesiyle elde edilen S2 serisi emülsiyon formülasyonlarının görünüşleri Görsel 3.14’te ve sonuçları EK 2’de verilmiştir. Buna göre, S2-2 ve S2-3 yoğun ve bulanık özelliktedir. S2-4 bulanık ve jel

kıvamındayken S2-5 süt görünümünde ve jel kıvamındandır. Bu seri emülsiyonlara karakterizasyon ve stabilite çalışmaları yapılmamıştır.



**Görsel 3.14.** 2:8 (a:a) oranında Susam yağı:(Tween 20:Span 80, 1:1) hazırlanan emülsiyonların görünümleri.

Bu tez çalışmasında son olarak; 3:8 (a:a) oranında susam yağı ve sürfaktan karışımının birleştirilmesiyle S3 serisi emülsiyon formülasyonları elde edilmiştir. Bu emülsiyonların görünümleri Görsel 3.15'te ve EK 2'de verilmiştir. Bu serinin görüntü özellikleri S2 serisi ile benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde, S3-2 ve S3-3 bulanık görünümde ve yoğun kıvamdadır. S3-3 ve S3-4 jel kıvamındadır. Bu seride şeffaf ve yarı şeffaf özellikte emülsiyon elde edilemediği için stabilite çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Jel formülasyonlarda bir değişiklik gözlenmemesine rağmen bulanık olan S3-2 ve S3-3'te faz ayrımı ve S3-6, S3-10 arası emülsiyonlarda kremalaşma gözlenmiştir.



**Görsel 3.15.** 3:7 (a:a) oranında Susam yağı:(Tween 20:Span 80, 1:1) hazırlanan emülsiyonların görünümleri.

### 3.4. Stabil Emülsiyonlarda Yapılan Ölçümler

Hızlandırılmış stabilite testleri kapsamında gerçekleştirilen santrifüjleme, dondurma-çözdürme ve ısıtma soğutma testleri sonucunda K1-4, K2-4, K2-5, R1-3 ve R2-5 stabil bulunmuştur. Bu 5 farklı emülsiyonunda tip tayini ve reolojik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.1. Emülsiyon tip tayini sonuçları

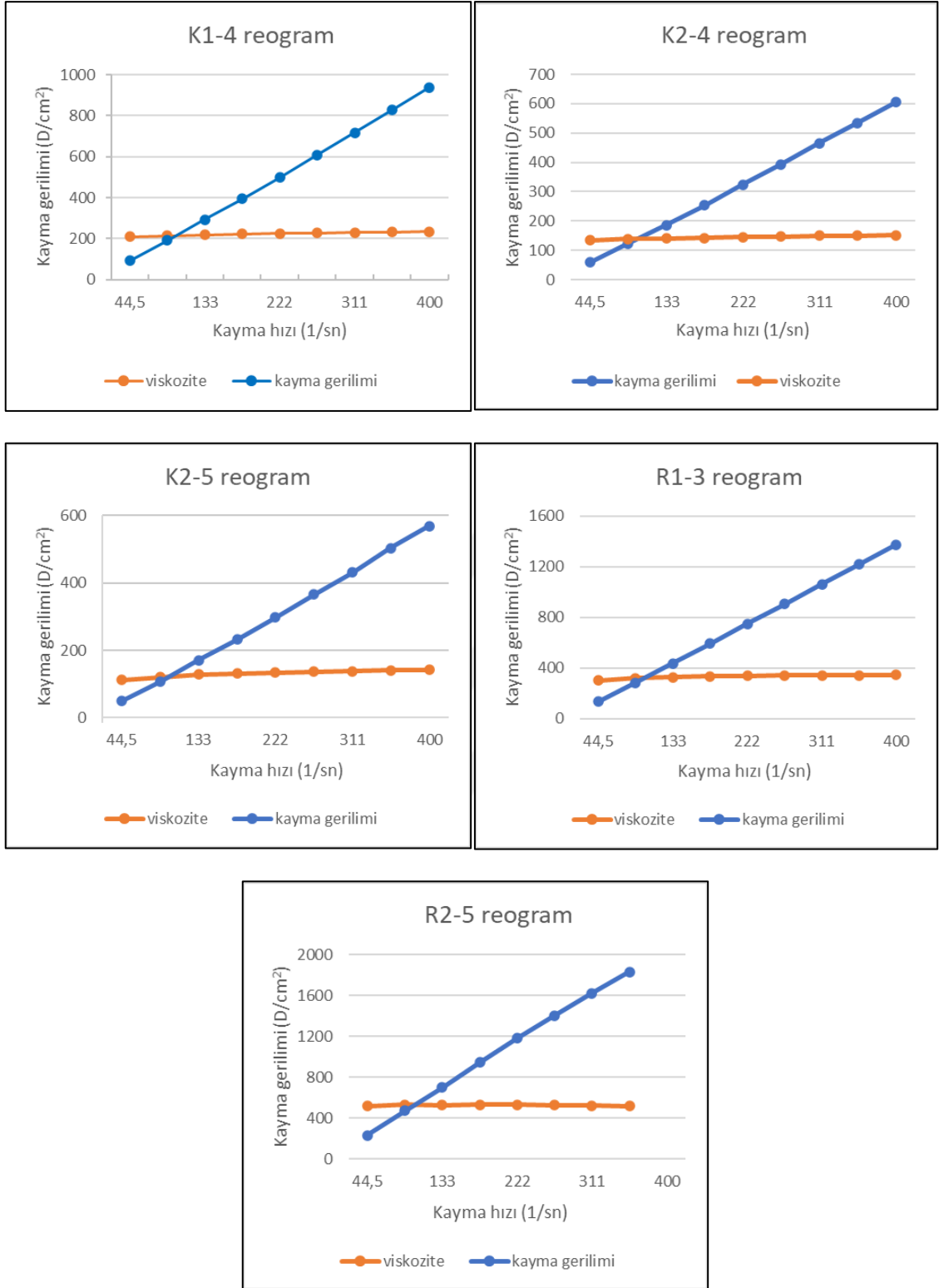
Stabil olduğu tespit edilen 5 emülsiyon formülasyonun tipi, boyama testi ile belirlenmiştir. Emülsiyonlara metilen mavisi eklendiğinde boyanın hızlıca dağıldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte sudan kırmızısı eklendiğinde boyanın dağılmadığı belirlenmiştir. Buna göre 5 farklı emülsiyonun da Y/S tipinde olduğu tespit edilmiştir.

### 3.4.2. Reolojik ölçüm (Viskozite) sonuçları

Bu tez çalışmasında, stabil olduğu tespit edilen K1-4, K2-4, K2-5, R1-3 ve R2-5 emülsiyonlarının reolojik ölçümleri yapılmıştır ve elde edilen viskozite değerleri Tablo 3.5'te ve reogramlar Şekil 3.1'de verilmiştir. Buna göre, 0-400  $\text{sn}^{-1}$  kayma hızı aralığında ölçüm yapılmış ve kayma hızı ile kayma geriliminin orantılı şekilde artması nanoemülsiyon formülasyonlarının oda sıcaklığında *Newton* akış tipine uyduğunu göstermiştir. Mikroemülsiyon sistemleri genellikle düşük viskozite ve *Newton* akışı gösterir. Reolojik modellerinden *Newton* akış modelinde kayma gerilimi ile kayma hızı arasında doğrusal korelasyon bulunmaktadır (Alany ve Wen, 2008).

**Tablo 3.5.** Stabil olduğu tespit edilen emülsiyonların viskozite değerleri.

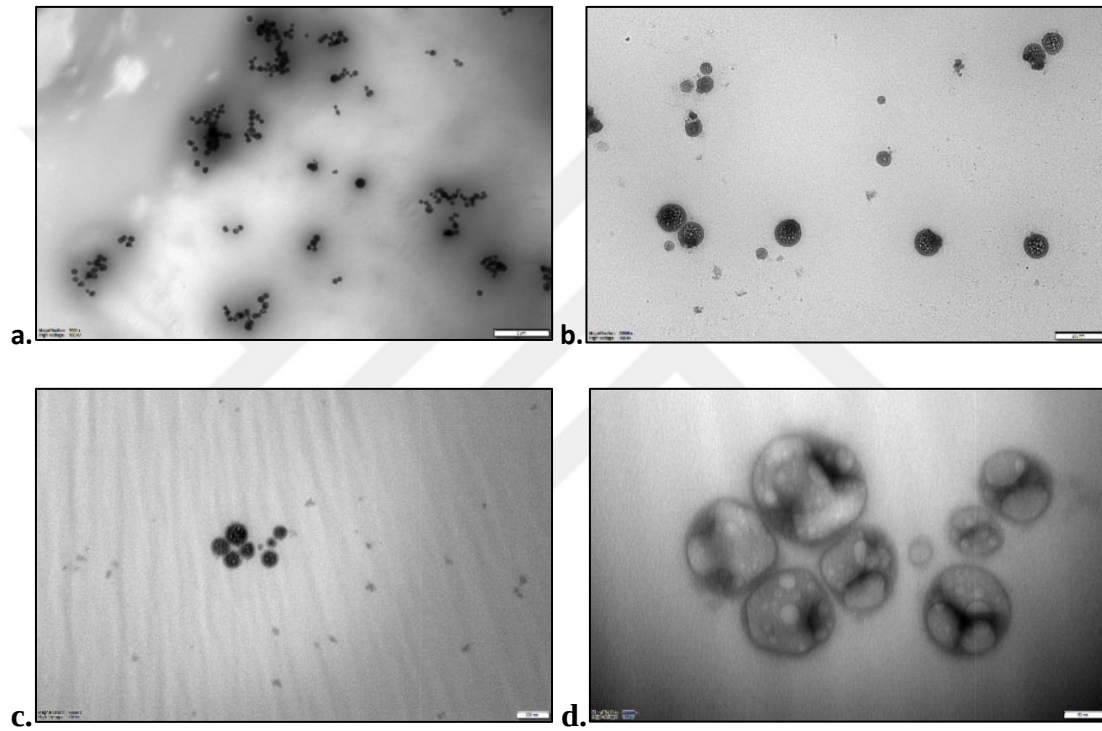
|             | Viskozite (cP) $\pm$ std |
|-------------|--------------------------|
| <b>K1-4</b> | 224,14 $\pm$ 8,30        |
| <b>K2-4</b> | 144,52 $\pm$ 5,89        |
| <b>K2-5</b> | 131,70 $\pm$ 10,11       |
| <b>R1-3</b> | 331,06 $\pm$ 14,47       |
| <b>R2-5</b> | 525,07 $\pm$ 6,29        |



Şekil 3.1. Stabil olduğu tespit edilen nanoemülsiyonlara ait reogramlar.

### 3.4.3. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) sonuçları

Kişniş uçucu yağı içeren K2-4 emülsiyonunun morfolojik özellikleri ve damlacıkların şekli TEM görüntüleri incelenerek belirlenmiştir. Buna göre, nanoemülsiyon damlacıklarının neredeyse küresel şekilde olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında emülsiyon formülasyonunun nano boyutta damlacıklar içerdiği doğrulanmıştır. Ancak, Zeta sizer ile ölçülenden daha büyük damlacıklar da (yaklaşık 100 nm) tespit edilmiştir. TEM sonuçları Görsel 3.16'da verilmiştir.



**Görsel 3.16.** K2-4 formülasyonunun geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri; a. 7.000x büyütme, ölçek 2.000 nm, b. 60.000x büyütme, ölçek 200 nm, c. 40.000x büyütme, ölçek 200 nm, d. 200.000x büyütme, ölçek 50 nm.

### 3.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Biberiye, kişniş uçucu yağları ve bu iki uçucu yağın 1:1 (a:a) oranında birleşiminden kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi ile elde edilen nanoemülsiyonların *in vitro* anti-enflamatuvar etki denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için; stabilite testleri öncesinde PDI değerleri 0,3'ten küçük olan nanoemülsiyonlar seçilerek sodyum fosfat tamponu ile istenilen konsantrasyona (10 mg/mL) getirilmiştir. Bu tez çalışmasında, saf uçucu yağlar ve 1:1 oranında birleşimleri etanol %10 (h/h) ile çözülerek

nanoemülsiyon formülasyonlarının biyolojik etki sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bunun yanında, stabilite testleri öncesinde ve sonrasında *in vitro* lipoksijenaz inhibisyonu deneyleri gerçekleştirilerek damlacık boyutundaki değişimin numunelerin *in vitro* anti-enflamatuvar aktivitelerine olan etkileri incelenmiştir. Son olarak; saf uçucu yağların, bu uçucu yağların 1:1 (a:a) karışımlarının ve stabil olduğu tespit edilen nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* kolinesteraz (AChE ve BChE) aktiviteleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.5.1. *In vitro* anti-enflamatuvar (5-Lipoksijenaz enzim aktivitesi inhibisyonu) aktivite sonuçları**

Numunelerin 7,9 U/mg konsantrasyonda lipoksijenaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi mikro düzeylerde spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Linoleik asidin substrat olarak kullanılmasıyla 10 dk süreyle absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar, standart madde olarak kullanılan NDGA ile karşılaştırılmıştır. NDGA farklı çalışma konsantrasyonlarında (12, 8, 4, 2, 1 ve 0,5 µg/mL) hazırlanmıştır ve EC50 hesaplaması yapılmıştır. Numunelerin çalışma konsantrasyonları 200 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada; DMSO ile çözülerek hazırlanan numuneler seyreltildiğinde bulanıklık gözlenmiştir. Bu nedenle, sadece etanol ile çözülerek hazırlanan numuneler ile çalışılmıştır ve sonuçlar verilmiştir. İstenilen konsantrasyona getirilmeleri aşamasında tampon çözelti ile seyreltilen bazı nanoemülsiyonlarda bulanıklık oluşmuştur. Bu nedenle, Tablo 3.6’da gösterildiği gibi ilgili numunelerle çalışılmamıştır.

Etanol ile çözülerek hazırlanan kişniş uçucu yağı, biberiye uçucu yağı ve kişniş:biberiye (1:1, a:a) uçucu yağ karışımının 5-LOX inhibisyonu ile tespit edilen anti-enflamatuvar etkisi sırasıyla %28,22±2,29, %44,80±0,92 ve %58,59±2,71 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, bu yöntemde 200 µg/mL konsantrasyondaki biberiye uçucu yağı kişniş uçucu yağından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Kişniş:biberiye (1:1) uçucu yağ karışımı ise diğer iki uçucu yağın etkisinden daha yüksek inhibe edici etki göstermiştir.

Biyolojik aktivite çalışmaları öncesinde nanoemülsiyonların içerdiği uçucu yağ miktarı 10 mg/mL olarak hazırlanmıştır. Sonuçta; nanoemülsiyonların uçucu yağ miktarları sabit değerde iken Tween 20, su fazı miktarları ve damlacık boyutları farklılık göstermektedir.

Sonuçlara bakıldığında, kişniş uçucu yağının etken madde ve yağ fazı olarak kullanılmasıyla hazırlanan kişniş nanoemülsiyonlarının stabilite çalışmaları öncesinde göstermiş oldukları 5-LOX inhibisyonu ile tespit edilen anti-enflamatuvar etki açısından en düşük %37,22 ile K3-4 ve en yüksek %72,73 ile K1-2 formülasyonu belirlenmiştir. K1-2 en yüksek anti-enflamatuvar etkiyi göstermesine rağmen, stabilite çalışmaları sonrasında faz ayrımı gözlemlendiği için çalışılmamıştır. K3-4 en düşük etkiyi göstermesine rağmen stabilite çalışmaları sonrasında  $53,06 \pm 2,47$  ile kişniş nanoemülsiyonları arasında en yüksek etkiyi göstermiştir. Tablo 3.6'da olduğu üzere stabilite çalışmaları sonrasında K1-4, K2-3 ve K3-5'te dikkate değer bir aktivite değişimi gözlenmemiştir. Ancak, K2-4, K2-5 ve K2-6'nın lipoksijenaz inhibisyon etkisi belirgin bir şekilde azaldığı anlaşılmıştır. Bu formülasyonlardan çoğunun anti-enflamatuvar etkisinin kişniş uçucu yağının etkisinden ( $28,22 \pm 2,29$ ) daha yüksek değerler verdiği Tablo 3.6'da görülmektedir. Ayrıca, K2-4, K2-5 ve K2-6 stabilite testleri sonrasında kişniş uçucu yağı ile yaklaşık olarak aynı etkiyi (sırasıyla  $30,49 \pm 2,03$ ,  $25,82 \pm 0,65$  ve  $30,55 \pm 2,77$ ) göstermiştir.

Biberiye uçucu yağının nanoemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* anti-enflamatuvar etkisi sonuçları da Tablo 3.6'da verilmiştir. Nanoemülsiyonların seyreltilmeleri aşamasında R3-3 formülasyonunda bulanıklık oluşması nedeniyle bu numune ile çalışılamamıştır. Sonuçlara bakıldığında, R2-5 ( $19,58 \pm 1,76$ ) dışında diğerlerinin biberiye uçucu yağı ( $44,80 \pm 0,92$ ) ile yaklaşık olarak aynı değerlerde inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Stabilite çalışmaları sonrasında R1-2 ve R2-2'de faz ayrımı gözlenmiştir ve bu numunelerle çalışmalar sürdürülmemiştir. R2-5 en düşük 5-LOX inhibisyon etkisini gösterirken stabilite çalışmaları sonrasında biberiye uçucu yağı ile yaklaşık aynı değeri ( $49,42 \pm 2,13$ ) hesaplanmıştır. Bunun yanında; R1-3'ün anti-enflamatuvar aktivitesinin stabilite testleri öncesi ölçümlere arttığı tespit edilmiştir ve inhibisyon değeri  $62,84 \pm 3,33$  olarak bulunmuştur.

Kışniş:biberiye (1:1, a:a) uçucu yağ karışımının yağ fazı ve etken madde olarak kullanılmasıyla hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının anti-enflamatuvar etki sonuçları Tablo 3.6'da verilmiştir. Bu emülsiyonlardan RK3-3 ve RK3-4 seyrelme aşamasında oluşan bulanıklık nedeniyle bu numunelerle çalışılmamıştır. RK1-3, RK1-4 ve RK1-5'in inhibisyon yüzdesi, saf uçucu yağ karışımının ( $58,59 \pm 2,71$ ) anti-enflamatuvar etkisiyle yaklaşık aynı değerlerdedir. Stabilite çalışmalarından sonra RK1-

3 numunesinde dikkate değer bir değişiklik gözlenmezken RK1-4, RK1-5'te daha düşük aktivite gözlenmiştir, ancak RK2-3'te aktivitenin oransal olarak arttığı dikkat çekmiştir.

5-Lipoksijenaz inhibisyonu ile *in vitro* anti-enflamatuvar aktivitenin belirlendiği bu tez çalışmasında, standart olarak kullanılan NDGA'nın EC<sub>50</sub> değeri 3,7±0,23 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, uçucu yağlar ve nanoemülsiyonların anti-enflamatuvar etkileri NDGA ile karşılaştırıldığında nispeten düşüktür.

**Tablo 3.6.** Uçucu yağların, emülsiyonların ve standart madde NDGA'nın karşılaştırmalı lipoksijenaz inhibisyonu sonuçları.

| Numune<br>(200 µg/mL)                            | Stabilite çalışmaları öncesinde<br>% inhibisyon±std | Stabilite çalışmaları sonrasında<br>% inhibisyon±std |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Kişniş uçucu yağı                                | 28,22±2,29                                          | -                                                    |
| Biberiye uçucu yağı                              | 44,80±0,92                                          | -                                                    |
| Kişniş:biberiye (1:1, a:a)<br>uçucu yağ karışımı | 58,59±2,71                                          | -                                                    |
| K1-2                                             | 72,73±2,39                                          | -                                                    |
| K1-4                                             | 39,03±3,80                                          | Faz ayrımı                                           |
| K2-3                                             | 56,31±3,35                                          | 43,57±2,02                                           |
| K2-4                                             | 41,70±2,88                                          | 51,96±1,36                                           |
| K2-5                                             | 38,63±4,08                                          | 30,49±2,03                                           |
| K2-6                                             | 51,61±2,54                                          | 25,82±0,65                                           |
| K3-4                                             | 37,22±0,75                                          | 30,55±2,77                                           |
| K3-5                                             | 38,08±2,60                                          | 53,06±2,47                                           |
| R1-2                                             | 45,89±3,96                                          | 37,91±2,50                                           |
| R1-3                                             | 45,89±2,60                                          | -                                                    |
| R1-5                                             | 36,37±5,10                                          | Faz ayrımı                                           |
| R2-2                                             | 49,05±2,95                                          | 62,84±3,33                                           |
| R2-3                                             | 41,68±2,69                                          | 46,31±5,04                                           |
| R2-5                                             | 19,58±1,76                                          | -                                                    |
| R3-3                                             | -                                                   | Faz ayrımı                                           |
| RK1-3                                            | Bulanıklık                                          | 47,35±1,42                                           |
| RK1-4                                            | 57,22±3,09                                          | 49,42±2,13                                           |
| RK1-5                                            | 62,21±3,88                                          | -                                                    |
| RK2-3                                            | 64,78±2,08                                          | Bulanıklık                                           |
| RK3-3                                            | 40,78±3,26                                          | 64,8±1,82                                            |
| RK3-4                                            | -                                                   | 46,40±3,64                                           |
| NDGA (12 µg/mL)                                  | 98,14±0,28                                          | 39,18±3,02                                           |
| NDGA (8 µg/mL)                                   | 76,77±0,81                                          | 48,21±0,80                                           |
| NDGA EC <sub>50</sub> (µg/mL)                    | 3,70±0,23                                           | -                                                    |

±std: standart sapma

- ölçüm yapılmamıştır

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında biberiye uçucu yağının 5-lipoksijenaz inhibisyonu etkisi 200 µg/mL konsantrasyonda  $44,8 \pm 0,92$  bulunmuştur. Biberiye uçucu yağı ile hazırlanan nanoemülsiyonların 5-lipoksijenaz inhibisyonu ile tespit edilen anti-enflamatuvar etkisi ise R1-3 dışında, uçucu yağın etkisine yakın değerlerde gözlenmiştir. R1-3 (%8 yağ, %72 Tween 20 ve %20 su fazı) formülasyonunda stabilite çalışmaları sonrasında etkinin biraz arttığı ( $45,89 \pm 2,6 \rightarrow 62,84 \pm 3,33$ ) gözlenmiştir. Bu formülasyonun stabilite çalışmaları sonrasında PDİ değerinin değişmemesi ( $\sim 0,3$ ) ve diğer biberiye uçucu yağı nanoemülsiyonlarına göre daha küçük damlacık boyutları içermesi ( $15,05 \pm 0,199$  nm) dikkat çekmektedir. Baylac ve Racine (2003) bir çalışmada biberiye uçucu yağının *in vitro* 5-lipoksijenaz inhibisyonu etkisini ( $51 < IC_{50} \leq 100$  µg/mL) rapor etmişlerdir ve bu çalışmada biberiye uçucu yağının anti-enflamatuvar aktivitesinin NDGA ( $IC_{50}: 5 \pm 0,5$  µg/mL) ile karşılaştırıldığında nispeten düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez kapsamında kişniş uçucu yağının 5-lipoksijenaz inhibisyonu  $28,22 \pm 2,29$  olarak belirlenmiştir. Güncel literatürde, kişniş uçucu yağının *in vitro* lipoksijenaz inhibisyonu ile tespit edilen anti-enflamatuvar aktivite çalışmalarına bilgimiz dahilinde rastlanmamıştır. Haj ve diğerlerinin (2003) çalışmada hayvan modelinde denenen karragenan testinde, %80 linalol içeren kişniş uçucu yağı anti-enflamatuvar etki göstermemiştir.

Literatürde uçucu yağ nanoemülsiyonlarının elde edilerek anti-enflamatuvar etkilerinin değerlendirildiği çalışmalara bilgimiz dahilinde rastlanmamıştır. Bu nedenle, biberiye ve kişniş uçucu yağları nanoemülsiyonlarının 5-lipoksijenaz inhibisyonu ile *in vitro* anti-enflamatuvar aktivitelerinin belirlenmesi bu tez çalışmasında ilk defa gerçekleştirilmiştir.

#### **3.5.1.1. Damlacık boyutunun anti-enflamatuvar aktivite sonuçlarına etkileri**

Kişniş uçucu yağı nanoemülsiyonları arasında en yüksek anti-enflamatuvar etkiyi ( $72,73 \pm 2,39$ ) K1-2 göstermiştir. K1-2 formülasyonu,  $11,45 \pm 0,54$  nm boyutunda (PDİ:  $0,308 \pm 0,006$ ) damlacıklar içermektedir. Tablo 3.7’de görüldüğü gibi, K1-4 ( $11,32 \pm 1,64$  nm), K2-4 ( $10,74 \pm 0,232$  nm), K2-5 ( $11,86 \pm 0,47$  nm), K3-4 ( $14,44 \pm 0,1833$  nm) ve K3-5 ( $11,65 \pm 0,5011$  nm) yaklaşık olarak aynı etkileri göstermiştir. Stabilite çalışmalarına maruz bırakılan numunelerin damlacık boyutlarıyla birlikte anti-enflamatuvar etkileri de değişiklik göstermiştir. Buna göre, stabilite testlerinden sonra damlacık boyutları dikkate

değer bir şekilde değişen nanoemülsiyonlar K3-4 ( $14,44 \pm 0,1833$  nm  $\rightarrow$   $120,5 \pm 1,115$  nm) ve K3-5 ( $11,65 \pm 0,5011$  nm  $\rightarrow$   $70,47 \pm 1,863$  nm)'dir. K3-4'ün anti-enflamatuvar etkisi artarken K3-5'in etkisi değişmemiştir. Bunların yanında damlacık boyutları değişmeyen ve PDİ değeri 0,3'ün altında olan nanoemülsiyonlardan K1-4'ün etkisi yaklaşık olarak aynı olduğu belirlenmiştir ve K2-4 ve K2-5'in etkisi ise azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, stabilite çalışmaları öncesinde damlacık boyutları yakın değerlerde olan nanoemülsiyonlarda anti-enflamatuvar etki yaklaşık olarak aynı düzeyde stabilite çalışmaları sonrasında bu uyumluluk ve tutarlılık ortadan kalkmıştır.

Bu tez çalışmasında, 200 µg/mL konsatrasyondaki kişniş uçucu yağının 5-lipoksijenaz inhibisyonu  $\%28,22 \pm 2,29$  olarak tespit edilmiştir. Bu uçucu yağdan hazırlanan nanoemülsiyonların anti-enflamatuvar etkilerinde artış olduğu belirlenmiştir. K1-4 formülasyonu ( $11,32 \pm 1,64$  nm) stabilite çalışmaları sonrasında da uçucu yağdan daha yüksek inhibisyon etkisi ( $\%39,03 \pm 3,80 \rightarrow \%43,57 \pm 2,02$ ) göstermiştir. Ancak, K2-4 ( $11,97 \pm 0,82$  nm) ve K2-5 ( $11,18 \pm 0,59$  nm)'in stabilite çalışmaları sonrasında anti-enflamatuvar etkilerinin azaldığı gözlenmiştir.

**Tablo 3.7.** Nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutları, PDİ ve zeta potansiyel değerleri.

| Numune       | Damlacık boyutu (nm) | PDİ              | Zeta potansiyel   | Stabilite çalışmaları sonrası      |                                    |                                    |
|--------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|              |                      |                  |                   | Damlacık boyutu (nm)               | PDİ                                | Zeta potansiyel                    |
| <b>K1-2</b>  | $11,45 \pm 0,54$     | $0,308 \pm 0,01$ | $-5,44 \pm 0,17$  | - Faz ayrımı olmuştur.             |                                    |                                    |
| <b>K1-4</b>  | $11,32 \pm 1,64$     | $0,321 \pm 0,02$ | $-6,20 \pm 0,3$   | <b><math>11,93 \pm 0,76</math></b> | <b><math>0,322 \pm 0,02</math></b> | <b><math>-3,26 \pm 0,06</math></b> |
| <b>K2-3</b>  | $31,67 \pm 9,27$     | $0,147 \pm 0,07$ | $-14,6 \pm 0,21$  | $16,70 \pm 0,20$                   | $0,505 \pm 0,01$                   | -                                  |
| <b>K2-4</b>  | $10,74 \pm 0,23$     | $0,216 \pm 0,02$ | $-11,5 \pm 2,79$  | <b><math>11,97 \pm 0,82</math></b> | <b><math>0,338 \pm 0,04</math></b> | <b><math>-4,64 \pm 0,04</math></b> |
| <b>K2-5</b>  | $11,86 \pm 0,47$     | $0,259 \pm 0,02$ | $-9,875 \pm 1,45$ | <b><math>11,18 \pm 0,59</math></b> | <b><math>0,196 \pm 0,03</math></b> | <b><math>-7,03 \pm 0,55</math></b> |
| <b>K2-6</b>  | $14,69 \pm 1,69$     | $0,309 \pm 0,02$ | $-9,681 \pm 0,34$ | $18,13 \pm 6,19$                   | $0,376 \pm 0,08$                   | -                                  |
| <b>K3-4</b>  | $14,44 \pm 0,18$     | $0,316 \pm 0,03$ | $-4,59 \pm 0,99$  | $120,5 \pm 1,11$                   | $0,367 \pm 0,15$                   | -                                  |
| <b>K3-5</b>  | $11,65 \pm 0,50$     | $0,165 \pm 0,06$ | $-9,63 \pm 0,52$  | $70,47 \pm 1,86$                   | $0,678 \pm 0,04$                   | -                                  |
| <b>R1-2</b>  | $10,36 \pm 0,05$     | $0,291 \pm 0,01$ | $-12,85 \pm 0,49$ | - Faz ayrımı olmuştur.             |                                    |                                    |
| <b>R1-3</b>  | $28,39 \pm 13,30$    | $0,339 \pm 0,03$ | $-9,61 \pm 0,69$  | <b><math>15,05 \pm 0,2</math></b>  | <b><math>0,340 \pm 0,04</math></b> | <b><math>-6,42 \pm 1,38</math></b> |
| <b>R1-5</b>  | $31,88 \pm 15,67$    | $0,277 \pm 0,08$ | $-11,08 \pm 2,15$ | $25,79 \pm 20,66$                  | $0,409 \pm 0,08$                   | -                                  |
| <b>R2-2</b>  | $17,14 \pm 0,82$     | $0,356 \pm 0,02$ | $-5,14 \pm 0,06$  | - Faz ayrımı olmuştur.             |                                    |                                    |
| <b>R2-3</b>  | $14,77 \pm 1,8$      | $0,358 \pm 0,06$ | $-7,53 \pm 2,14$  | $43,77 \pm 3,06$                   | $0,356 \pm 0,05$                   | -                                  |
| <b>R2-5</b>  | $32,17 \pm 18,76$    | $0,338 \pm 0,02$ | $-8,48 \pm 0,2$   | <b><math>30,98 \pm 9,69</math></b> | <b><math>0,319 \pm 0,01</math></b> | <b><math>-1,18 \pm 0,63</math></b> |
| <b>R3-3</b>  | $14,32 \pm 0,38$     | $0,384 \pm 0,02$ | $-2,815 \pm 0,47$ | $19,90 \pm 1,11$                   | $0,480 \pm 0,05$                   | -                                  |
| <b>RK1-3</b> | $21,07 \pm 8,57$     | $0,348 \pm 0,02$ | $-10,9 \pm 1,13$  | $14,83 \pm 1,90$                   | $0,477 \pm 0,06$                   | -                                  |
| <b>RK1-4</b> | $15,20 \pm 2,39$     | $0,324 \pm 0,03$ | $-12,7 \pm 0,14$  | $14,15 \pm 0,68$                   | $0,408 \pm 0,04$                   | -                                  |
| <b>RK1-5</b> | $17,76 \pm 5,36$     | $0,278 \pm 0,06$ | $-10,3 \pm 0,56$  | $362,1 \pm 24,80$                  | $0,448 \pm 0,08$                   | -                                  |
| <b>RK2-3</b> | $10,48 \pm 0,16$     | $0,247 \pm 0,01$ | $-5,20 \pm 1,95$  | $18,92 \pm 2,01$                   | $0,510 \pm 0,03$                   | -                                  |
| <b>RK3-3</b> | $12,87 \pm 0,39$     | $0,235 \pm 0,05$ | $-2,815 \pm 0,47$ | $26,87 \pm 0,45$                   | $0,580 \pm 0,06$                   | -                                  |
| <b>RK3-4</b> | $14,6 \pm 1,73$      | $0,352 \pm 0,01$ | $-9,90 \pm 1,56$  | $28,89 \pm 2,53$                   | $0,689 \pm 0,02$                   | -                                  |

- ölçüm yapılmamıştır

Bilgimiz dahilinde, bu tez çalışması ile 200 µg/mL çalışma konsantrasyonunda uçucu yağ içeren ve farklı damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonların farklı yüzdelerde 5-lipoksijenaz inhibisyonu gösterdiği ilk kez belirlenmiştir. Bu farklılığın nanoemülsiyonların içerdiği damlacık boyutu ve polidispersitedeki değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Onodera ve diğerlerinin (2015) bir çalışmasında, kurkumin lipit nanoemülsiyonu, modifiye edilmiş ince film hidrasyon ve sonikasyon yöntemi ile çeşitli partikül boyutlarında (50, 100 ve 200 nm) hazırlanmıştır. En güçlü anti-enflamatuvar ve anti-alerjik etkiyi 100 nm kurkumin lipit nanoemülsiyonu göstermiştir. İlgili çalışmada kurkumin lipit nanoemülsiyonlarının fizyolojik aktivitelerinin partikül boyutuna bağlı olarak farklılık gösterdiği açıkça bildirilmiştir.

### 3.5.2. *In vitro* antikolinesteraz etki sonuçları

Bu tez çalışmasında, hızlı stabilite testleri sonucunda stabil olduğu belirlenen nanoemülsiyonların ve saf uçucu yağların *in vitro* AChE ve BChE inhibisyonu standart maddeler ile karşılaştırılmıştır. Uçucu yağlar, nanoemülsiyonlar ve standart maddelerin antikolinesteraz inhibisyonu sonuçları Tablo 3.8’de verilmiştir. Buna göre, 250 µg/mL başlangıç konsantrasyonundaki saf kişniş uçucu yağı, biberiye uçucu yağı ve kişniş:biberiye (1:1, a:a) uçucu yağ karışımının asetilkolinesteraz inhibisyonu etkisi sırasıyla %23,55±0,38, %29,13±0,49 ve %25,10±0,69; anti-bütirikolinesteraz etkisi ise sırasıyla %18,44±0,25, %20,07±0,42 ve %20,82±0,37 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yağların AChE inhibisyonu yüzdeleri nispeten daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve biberiye uçucu yağının önemsenmeyecek düzeyde daha etkili olduğu bulunmuştur. Standart maddeler olan donepezil, takrin ve galantamin ise sırasıyla %98,25±0,93, %97,69±1,02 ve %84,26±0,86 AChE inhibisyonu ve %79,41±0,83, %98,58±0,99 ve %63,95±1,06 BChE inhibisyonu göstermiştir. Bu sonuçlar aynı konsantrasyondaki saf uçucu yağlar ve nanoemülsiyonlar ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.

Sonuç olarak; kişniş uçucu yağının stabil nano formülasyonunlarının (K1-4, K2-4 ve K2-5) elde edilmesi ile *in vitro* kolinesteraz inhibisyonunda dikkate değer bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde, biberiye uçucu yağı nanoemülsiyonlarından stabil olduğu belirlenen R1-3 ve R2-5 formülasyonunda da saf

uçucu yağ ile karşılaştırıldığında kolinesteraz inhibisyonlarının değişmediği tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında; biberiye uçucu yağının AChE inhibisyonu  $29,13 \pm 0,49$  ve BChE inhibisyonu  $20,07 \pm 0,42$ 'dir. Biberiye uçucu yağından elde edilen R1-3 (%8 yağ, %72 Tween 20 ve %20 su fazı) stabil nanoemülsiyonu ise uçucu yağın etkisine yakın değerlerde AChE ( $24,35 \pm 0,63$ ) ve BChE ( $21,26 \pm 0,57$ ) inhibisyonları göstermiştir. Mata ve diğerlerinin (2007) yapmış oldukları çalışmada %35,4 verbenon etken bileşenini içeren biberiye uçucu yağının asetilkolinesteraz inhibisyonu etkisi  $EC_{50}: 69,8 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$  bulunmuştur. Orhan ve diğerlerinin (2008) yapmış olduğu çalışmada biberiye uçucu yağının (%44,42 1,8-sineol ve %12,57  $\alpha$ -pinen) *in vitro* asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonları incelenmiştir. İlgili çalışmanın sonucunda, 1000  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda AChE inhibisyonu  $63,7 \pm 1,23$  ve BChE inhibisyonu  $74,0 \pm 0,79$  olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

**Tablo 3.8.** Uçucu yağların, emülsiyonların ve standart maddelerin karşılaştırmalı kolinesteraz inhibisyonu sonuçları.

| Numune (250 $\mu\text{g/mL}$ )                | AChE % inhibisyonu $\pm$ std | BchE % inhibisyonu $\pm$ std |
|-----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Kişniş uçucu yağı                             | $23,55 \pm 0,38$             | $18,44 \pm 0,25$             |
| Biberiye uçucu yağı                           | $29,13 \pm 0,49$             | $20,07 \pm 0,42$             |
| Kişniş:biberiye (1:1, a:a) uçucu yağ karışımı | $25,10 \pm 0,69$             | $20,82 \pm 0,37$             |
| KI-4                                          | $26,33 \pm 0,78$             | $20,15 \pm 0,38$             |
| K2-4                                          | $25,74 \pm 0,86$             | $21,33 \pm 0,51$             |
| K2-5                                          | $28,67 \pm 0,44$             | $20,49 \pm 0,28$             |
| RI-3                                          | $24,35 \pm 0,63$             | $21,26 \pm 0,57$             |
| R2-5                                          | $27,30 \pm 0,59$             | $19,52 \pm 0,4$              |
| Donepezil                                     | $98,25 \pm 0,93$             | $79,41 \pm 0,83$             |
| Takrin                                        | $97,69 \pm 1,02$             | $98,58 \pm 0,99$             |
| Galantamin                                    | $84,26 \pm 0,86$             | $63,95 \pm 1,06$             |

$\pm$ std: standart sapma

250  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyondaki kişniş uçucu yağının ve K1-4, K2-4 ve K2-5 formülasyonlarının *in vitro* asetilkolinesteraz inhibisyonu sırasıyla  $23,55 \pm 0,38$ ,  $26,33 \pm 0,78$ ,  $25,74 \pm 0,86$  ve  $28,67 \pm 0,44$ ; *in vitro* bütirilkolinesteraz inhibisyonu ise sırasıyla  $18,44 \pm 0,25$ ,  $20,15 \pm 0,38$ ,  $21,33 \pm 0,51$  ve  $20,49 \pm 0,28$  olarak belirlenmiştir. Yağ ve formülasyonların BchE inhibisyonu AchE inhibisyonu değerlerine

göre daha düşüktür. Bunun yanında, K2-5 dışındaki nanoemülsiyonların etkileri uçucu yağın etkisine yakın değerdedir. K2-5 (%12 yağ, %48 Tween 20 ve %40 su fazı) formülasyonunun AchE inhibisyonunun saf uçucu yağ (%23,55±0,38) ile karşılaştırıldığında arttığı (%28,67±0,44) belirlenmiştir. Literatürde kişniş uçucu yağının antikolinesteraz etkisinin incelendiği çalışmalara bilgimiz dahilinde rastlanmamıştır, elde edilen sonuçlar ilk defa bu tez çalışmasıyla bildirilmektedir.



#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME

Genel olarak canlı metabolizmasında birçok reaksiyon hidrofilik yani “su” ortamında gerçekleşir ve dolayısıyla aktif bileşenlerin suda çözünerek dağılımı ve atılımı önemlidir. Bilindiği üzere uçucu yağlar lipofilik yapılarından dolayı suda sınırlı çözünürlüğe sahiptir ve bu nedenle farmasötik, gıda vb. alanlarda uygulamaları ve kullanımları teknolojik açısından sınırlıdır (Chouhan vd., 2017; Wright, 1991). İnhalasyon haricinde, doğrudan veya farklı yollarda uygulandıklarında çeşitli toksik etkileri olan uçucu yağlar, nanoemülsiyonları halinde formüle edildiklerinde su ile seyrelmiş ve stabil hale dönüştürülebilmektedir (Barradas ve Holanda e Silva, 2021).

Mevcut tez çalışması kapsamında, Anadolu’da çeşitli SSS hastalıklarında halk arasında kullanılan bitkilerden Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) toprak üstü kısımları ve kişniş (*Coriandrum sativum*) tohumları hammadde olarak belirlenmiştir. Uçucu yağlar biyolojik aktivitelerinden dolayı ilaç etken ve yardımcı maddesi olarak sağlık sektöründe, aromaterapide başarılı örneklerle temsil edilmektedir. Bu amaçla kullanılacak bitkisel preparatlar ve yardımcı maddeleri Farmakope standartlarında olmak zorundadır. Bu nedenle, potansiyel yeni formülasyonlar geliştirmek üzere biberiye ve kişniş uçucu yağları Farmakope kalitesinde temin edilmiştir ve kromatografik analizleri yapılarak kaliteleri teyit edilmiştir. Daha sonra, ilgili uçucu yağların Y/S nanomemülsiyonları hazırlanmıştır. Bu şekilde, uçucu yağların uygulamaları ve formülasyonları sırasında problem oluşturan çözünürlüğe bağlı sınırlamalar büyük ölçüde elimine edilmiştir. Bu tezin son aşamasında, biberiye ve kişniş uçucu yağı nanoemülsiyonlarının, SSS hastalıklarında görülen, 5-LOX kaynaklı enflamasyon ve asetilkolinesteraz/bütirikolinesteraz kaynaklı sinir sistemi fonksiyonunun tahribatı üzerindeki olası etkileri, *in vitro* enzim inhibisyonu çalışmalarıyla gösterilmiştir. Güncel kaynaklarda biberiye ve kişniş uçucu yağlarının doğrudan santral sinir sistemi hedefli nanoemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasına ve biyolojik aktivitelerinin test edilmesine bilğimiz dahilinde rastlanmamıştır ve bu nedenle tez çalışmasının özgün değerlerindendir.

Tez kapsamında; düşük enerjili ve kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi olan su titrasyonu kullanılmıştır. Bu yöntem karıştırma altında su titrasyonu prensibine dayanmaktadır ve emülsiyonlaşma için gerekli enerjiyi kendi sisteminden sağlamaktadır. Kendiliğinden emülsiyonlaşma yöntemi ile basit ve düşük maliyetle nanoemülsiyonlar elde edilebilmektedir (McClements, 2021; 83rabi., 2021). Literatürdeki bazı çalışmalarda uçucu yağların nanoemülsifikasyonunda daha küçük damlacıklar elde etmek için yağ

fazının ısıtılmasını gerektiren homojenizasyon, faz dönüşümü ve ultrasonikasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır (Ghosh vd., 2013-1; Sugumar vd., 2014-2; Saranya vd., 2012). Ancak, uçucu yağların içerdiği birçok bileşen ısıtma ile kaybolacak ve uçucu yağın içeriği değişime uğrayacaktır. Bu nedenle uçucu yağların nanoteknolojisi ile ilgili çalışmalarda ısıtma adımının olmadığı kendiliğinden emülsiyonlaşma gibi yöntemlerin kullanılması daha doğru sonuçlar verecektir.

Uçucu yağların DMSO, etanol, metanol vb. içerisinde çözülerek biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmalarına literatürde sık rastlanmaktadır (Mancianti ve Ebani, 2020; Darwish vd., 2020). Ancak, çözücü miktarının iyi ayarlanmadığı ve uçucu yağın çözücü ile tam çözülemediği durumlarda aktivite çalışmalarının sonuçları olumsuz etkilenmektedir. DMSO ile çözülen bir uçucu yağ distile su ile seyreltme aşamasında bulanıklık oluşmaktadır ve çözelti hafif ısınmaktadır. Oluşan bulanıklık spektrometre ile gerçekleştirilen çalışmalarda yüksek absorbans değerleri ile sonuçlanmaktadır ve numunenin aktivitesi yokmuş gibi sonuçlar vermektedir. Uçucu yağlar ile yapılan çalışmalarda DMSO'nun seyreltilmesi sonucu ısınma oluşması uçucu yağın etkili bileşenlerine zarar vererek fitokimyasal içeriğini değiştirebilmektedir. Çözücü ile hazırlanan bir uçucu yağ maksimum etki gösterse bile bu etkiyi gösterecek bir formülasyonda bulunmadıkça bir değeri olmayacaktır. Uçucu yağların farmasötik ve kozmetik uygulamalarında; uçucu yağ nanoemülsiyon formülasyonları ile çözünürlüğün sağlanması, aktivitenin gösterilmesi ve stabilitenin korunması mümkündür.

Bu çalışmalar, biberiye ve kişniş uçucu yağlarının nanoemülsifikasyonunun; çözünürlüğünün artırılması ve formülasyonu ile stabilitenin sağlanması için ümit verici bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ancak, nanoemülsiyon formülasyonlarının potansiyel SSS üzerindeki etkileri; stabilite, görüntüleme ve hayvan modellerinde biyolojik aktivite testleri gibi daha ileri çalışmalarla desteklenmelidir.

Nanoemülsiyonlar genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) farmasötik sürfaktanlar ile hazırlanmaktadır. Sulu fazdaki sürfaktan türü ve konsantrasyonu damlacıkların birleşmesine karşı iyi bir stabilite sağlayacak şekilde seçilmektedir. Nanoemülsiyonlarda diğer emülsiyon sistemlerine kıyasla daha az sürfaktan madde gerekmektedir. Büyük miktarda sürfaktan kullanımı oral ve topikal olarak uygulandığında gastrointestinal tahrişe ve cilt tahrişine neden olabilir. Kullanılacak sürfaktanın formülasyondaki asgari konsantrasyonunun bulunması gerekir. İyonik

olmayan sürfaktanlar, iyonik sürfaktanlara göre nispeten daha az toksiktir (Setya vd., 2014).

Su içinde yağ emülsiyonları şu anda birçok endüstriyel uygulamada en yaygın olarak kullanılan emülsiyon bazlı dağıtım sistemleridir. Yüksek enerjili yaklaşımlar şu anda gıda endüstrisinde emülsiyon üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoemülsiyonlar çok yönlü ve kullanışlı ilaç dağıtım sistemleri olarak sayısız uygulama alanında umut verici olmasına rağmen üretiminde bazı sınırlamalar vardır. İlaç ve gıda endüstrileri teknolojilerini nanoemülsiyon üretimine uyum sağlayacak şekilde ayarlamak zorundadır. Nanoemülsiyon hazırlama zorluğunun ve üretiminde yer alabilecek yüksek enerji girdisinin etkisi maliyeti oldukça yükseltmektedir (Lovelyn ve Attama, 2011; 85rabi., 2021).

Nanoemülsiyonların ağızdan alınmasıyla ilişkili, metabolik yolları değiştirebilmeleri ve üretiminde kullanılan bileşenlerin bazılarının potansiyel toksisitesinin olması gibi riskler vardır. Araştırma laboratuvarlarında geliştirilen yaklaşımların çoğu (Çözücü yer değiştirme yöntemleri vb), endüstriyel üretim tesislerinde ölçek büyütmek için uygun değildir (Mitri vd., 2012). Bu dezavantajlara rağmen Granalix BioTechnologies, hayvan modellerinde nörodejenerasyon hastalıklarını önlediği gösterilen nar çekirdeği yağı nanoemülsiyonu olan GranaGard™'ı ticari olarak piyasaya sürmüştür (Binyamin vd., 2015). Bunun yanında, Therapeutics Solutions International, Inc., düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleriyle resveratrolün daha güçlü bir analogu olan stabil pterostilbene (75-90 nm) nanoemülsiyonu olan ve ana bileşiğe göre daha iyi çözünürlüğe ve stabiliteye sahip NanoStilbene™ patentini almıştır (Aswathanarayan ve Vittal, 2019).

Genel olarak, nanoemülsiyonların içerdiği çok küçük damlacık boyutlarının kullanımıyla ilgili, lipofilik bileşenlerin emilim derecesini veya yolunu değiştirebilmeleri gibi bazı güvenlik endişeleri vardır. Nanoemülsiyonlar gibi nanopartiküllerin sindirimden sonraki potansiyel toksikolojik etkileri ve biyolojik akıbeti açıklanmamıştır (Lovelyn ve Attama, 2011; McClements, 2021). Bu nedenlerle özellikle uçucu yağların ve çözünür türevlerinin daha ileri çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Acharya, A., Moulik, S.P., Sanyal, S.K., Mishra, B.K., & Puri, P.M. (2002). Physicochemical investigations of microemulsification of coconut oil and water using polyoxyethylene 2-cetyl ether (Brij 52) and isopropanol or ethanol. *J. Colloid Interface Sci.*, 245(1), 163-170.
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 14(1), 3-15.
- Adams, M., Gmünder, F. ve Hamburger, M. (2007). Plants traditionally used in age related brain disorders-A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol.*, 113(3), 363-381.
- Aderibigbe, B.A. (2018). In situ-based gels for nose to brain delivery for the treatment of neurological diseases. *Pharmaceutics*, 10(40), 1-17.
- Agrawal, R., Mishra, B., Tyagi, E., Nath, C., Shukla, R. (2010). Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol. Res.*, 61(3), 247-252.
- Ahmad, N., Ahmad, R., Alam, M.A., Samim, M., Iqbal, Z., Ahmad, F. J. (2016). Quantification and evaluation of thymoquinone loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischemia. *Int. J. Biol. Macromol.*, 88, 320-332.
- Ajazuddin, S. S. (2010). Evaluation of physicochemical and phytochemical properties of Safoof-E-Sana, a Unani polyherbal formulation. *Pharmacogn. Res.*, 2(5), 318.
- Akan, H. ve Bakır, Y. (2015). Kâhta (Adıyaman) merkezi ve narince köyü'nün etnobotanik açıdan araştırılması. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 219-248.
- Alam, M.I., Beg, S., Samad, A., Baboota, S., Kohli, K., Ali, J., Ahuja, A., Akbar, M. (2010). Strategy for effective brain drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 40(5), 385-403.
- Alany, R.G., Wen, J. (2008). Microemulsions as drug delivery systems. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. New Jersey: John Wiley & Sons, 769-792.

- Altundag, E. ve Ozturk, M. (2011). Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc. Behav. Sci.*, 19, 756-777.
- Angelucci, F.L., Silva, V.V., Dal Pizzol, C., Spir, L.G., Praes, C.E.O., Maibach, H. (2014). Physiological effect of olfactory stimuli inhalation in humans: An overview. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 36(2), 117-123.
- Anilakumar, K.R., Pal, A., Khanum, F., Bawa, A.S. (2010). Nutritional, medicinal and industrial uses of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds-An overview. *Agric. Conspec. Sci.*, 75(4), 159-168.
- Anton, N., Benoit, J. P. ve Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. *J. Control. Release*, 128(3), 185-199.
- Anton, N. ve Vandamme, T.F. (2009). The universality of low-energy nanoemulsification. *Int. J. Pharm.*, 377(1-2), 142-147.
- Anton, N. ve Vandamme, T.F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharm. Res.*, 28(5), 978-985.
- Araújo, F.A., Kelmann, R.G., Araújo, B.V., Finatto, R.B., Teixeira, H.F., Koester, L.S. (2011). Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 42(3), 238-245.
- Aswathanarayan, J. B. ve Vittal, R. R. (2019). Nanoemulsions and their potential applications in food industry. *Front. Sustain. Food Syst.*, 3, 95.
- Azcan, N., Ertan, A., Demirci, B., Baser, K.H.C. (2004). Fatty acid composition of seed oils of twelve *Salvia* species growing in Turkey. *Chem. Nat. Compd.*, 40(3), 218-221.
- Badawy, M.E., Abdelgaleil, S.A., Mahmoud, N.F., Marei, A.E.S.M. (2018). Preparation and characterizations of essential oil and monoterpene nanoemulsions and acaricidal activity against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Int. J. Acarology*, 44(7), 330-333.
- Bajaj, S., Singla, D., Sakhuja, N. (2012). Stability testing of pharmaceutical products. *J. App. Pharm. Sci.*, 2(3), 129-138.

- Başer, K.H.C. ve Buchbauer, G. (2020). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. (3<sup>rd</sup> Edition). USA: CRC Press.
- Barbosa Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.D.F.F., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Quintans-Júnior, L.J. (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16(2), 258-285.
- Barradas, T.N., ve de Holanda e Silva, K.G. (2021). Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: A review. *Environ. Chem. Lett.*, 19(2), 1153-1171.
- Barzegar, H., Mehrnia, M.A., Nasehi, B., Alipour, M. (2018). Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: Effect of preparing conditions on droplet size. *Flavour Fragr. J.*, 33(5), 351-356.
- Baydar, H., Özkan, G., Erbaş, S., Altındal, D. (2009). Yield, chemical composition and antioxidant properties of extracts and essential oils of sage and rosemary depending on seasonal variations. *Acta. Hortic.* 826, 383-390.
- Baylac, S. ve Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *Int. J. Aromather.*, 13(2-3), 138-142.
- Berg, R.F., Moldover, M.R. ve Huang, J. S. (1987). Quantitative characterization of the viscosity of a microemulsion. *J. Chem. Phys.*, 87(6), 3687- 3691.
- Bergenståhl, B. (1997). Physicochemical aspects of an emulsifier functionality. G.L. Hasenhuettl ve R.W. Hartel (Editörler), *Food emulsifiers and their applications* içinde (147-172). Boston: Springer.
- Bhanushali, R.S., Gatne, M.M., Gaikwad, R.V., Bajaj, A.N., Morde, M.A. (2009). Nanoemulsion based intranasal delivery of antimigraine drugs for nose to brain targeting. *Indian J. Pharm. Sci.*, 71(6), 707-709.
- Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014(6), 1-14.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199.

- Binyamin, O., Larush, L., Frid, K., Keller, G., Friedman-Levi, Y., Ovadia, H., Abramsky, O., Magdassi, S., Gabizon, R. (2015). Treatment of a multiple sclerosis animal model by a novel nanodrop formulation of a natural antioxidant. *Int. J. Nanomedicine*, 10, 7165-7174.
- Bonferoni, M. C., Rossi, S., Sandri, G., Ferrari, F., Gavini, E., Rassu, G., Giunchedi, P. (2019). Nanoemulsions for “nose-to-brain” drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(2), 84.
- Borges, R.S., Ortiz, B.L.S., Pereira, A.C.M., Keita, H., Carvalho, J.C.T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J. Ethnopharmacol.*, 229, 29-45.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55(19), 7879-7885.
- Buchbauer, G., ve Baser, K. H. C. (2020). Effects of essential oils in the central nervous system. *Handbook of Essential Oils* içinde (287-320). USA: CRC Press.
- Bylaite, E., Nylander, T., Venskutonis, R., Jönsson, B. (2001). Emulsification of caraway essential oil in water by lecithin and  $\beta$ -lactoglobulin: Emulsion stability and properties of the formed oil-aqueous interface. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 20(4), 327-340.
- Cardenia, V., Waraho, T., Rodriguez-Estrada, M.T., Julian McClements, D., Decker, E.A. (2011). Antioxidant and prooxidant activity behavior of phospholipids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88(9), 1409-1416.
- Carvalho, R.H.R., Galvão, E.L., Barros, J.A.C., Conceição, M.M., Sousa, E.M.B.D. (2012). Extraction, fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract (*Sesamum Indicum* L.). *Braz. J. Chem. Eng.*, 29, 409-420.
- Chang, Y. ve McClements, D.J. (2014). Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: Influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *J. Agric. Food Chem.*, 62(10), 2306-2312.

- Chang, Y., McLandsborough, L. ve McClements, D.J. (2012). Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 60(48), 12056-12063.
- Chang, Y., McLandsborough, L. ve McClements, D.J. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *J. Agric. Food Chem.*, 61(37), 8906-8913.
- Chantrapornchai, W., Clydesdale, F. ve McClements, D.J. (1998). Influence of droplet size and concentration on the color of oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 46(8), 2914-2920.
- Chau, C.F., Wu, S.H., Yen, G.C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci. Technol.*, 18(5), 269-280.
- Cheong, J.N. ve Tan, C. P. (2010). Palm-based functional lipid nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112(5), 557-564.
- Cheraif, K., Bakchiche, B., Gherib, A., Bardaweel, S.K., Çol Ayvaz, M., Flamini, G., Ghareeb, M. A. (2020). Chemical composition, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of essential oils of six Algerian plants. *Molecules*, 25(7), 1-20.
- Chime, S.A., Kenekwukwu, F.C. ve Attama, A.A. (2014). Nanoemulsions-Advances in formulation, characterization and applications in drug delivery. A.D. Sezer (Editör), *Application of nanotechnology in drug delivery içinde* (77-126). Croatia, InTech.
- Choi, M.J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S.G., Ruktanonchai, U. (2009). Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion – diffusion method. *Food Res. Int.*, 42(1), 148-156.
- Chouhan, S., Sharma, K. ve Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils – present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Chu, B.S., Ichikawa, S., Kanafusa, S., Nakajima, M. (2007). Preparation and characterization of  $\beta$ -carotene nanodispersions prepared by solvent displacement technique. *J. Agric. Food Chem.*, 55(16), 6754-6760.
- Coimbra, M., Isacchi, B., van Bloois, L., Torano, J.S., Ket, A., Wu, X., Broere, F., Metselaar, J.M., Rijcken, C.J.F., Storm, G., Bilia, R., Schiffelers, R.M. (2011).

- Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int. J. Pharm.*, 416(2), 433-442.
- Costa Silva, B., Silva de Miranda, A., Guimaraes Rodrigues, F., Leticia Malheiros Silveira, A., Henrique de Souza Resende, G., Flavio Dutra Moraes, M., Carlos Pinheiro de Oliveira, A., Martins Parreiras, P., da Silva Barcelos, L., Martins Teixeira, M., Simao Machado, F., Lucio Teixeira, A., Simao Machado, F. (2015). The 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitor zileuton reduces inflammation and infarct size with improvement in neurological outcome following cerebral ischemia. *Curr. Neurovasc. Res.*, 12(4), 398-403.
- Çakilcioglu, U. ve Turkoglu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 132(1), 165-175.
- Çakilcioglu, U., Khatun, S., Turkoglu, I., Hayta, S. (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazığ-Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 137(1), 469-486.
- Dapčević Hadnađev, T., Dokić, P., Krstonošić, V., Hadnađev, M. (2013). Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 115(3), 313-321.
- Darwish, R.S., Hammada, H.M., Ghareeb, D.A., Abdelhamid, A.S., Harraz, F.M., Shawky, E. (2020). Efficacy-directed discrimination of the essential oils of three *Juniperus* species based on their in-vitro antimicrobial and anti-inflammatory activities. *J. Ethnopharmacol.*, 259, 1-12.
- De Moura Linck, V., da Silva, A.L., Figueiro, M., Piato, A.L., Herrmann, A.P., Birck, F. D., Caramão, E., Nunes, D.S., Moreno, P.R.H., Elisabetsky, E. (2009). Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, 16(4), 303-307.
- Demetriades, K., Coupland, J.N. ve McClements, D.J. (1997). Physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. *J. Food Sci.*, 62(3), 462-467.
- Demirci, F., Karaca, N., Tekin, M., Demirci, B. (2018). Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. Subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens. *Microb. Pathog.*, 122, 117-121.

- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.*, 23(6), 1473-1482.
- Dickinson, E., Galazka, V. B. ve Anderson, D. M. (1991). Emulsifying behaviour of gum 92rubic. Part 1: Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydr. Polym.*, 14(4), 373-383.
- Dickinson, E. ve Yamamoto, Y. (1996). Effect of lecithin on the viscoelastic properties of  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized emulsion gels. *Food Hydrocoll.*, 10(3), 301-307.
- Diniz do Nascimento, L., Moraes, A.A.B.D., Costa, K.S.D., Pereira Galúcio, J.M., Taube, P.S., Costa, C.M.L., Neves Cruz, J., de Aguiar Andrade, E.H., Faria, L.J.G. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: new findings and potential applications. *Biomolecules*, 10(7), 1-35.
- Dixit, N., Kohli, K. ve Baboota, S. (2008). Nanoemulsion system for the transdermal delivery of a poorly soluble cardiovascular drug. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 62(1), 46-55.
- Dobetsberger, C. ve Buchbauer, G. (2011). Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour Fragr. J.*, 26(5), 300-316.
- Duarte, J.L., Amado, J.R., Oliveira, A.E., Cruz, R.A., Ferreira, A.M., Souto, R.N., Falcão, D.Q., Carvalho, J.C.T., Fernandes, C. P. (2015). Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25(2), 189-192.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.*, 483(1-2), 220-243.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7(2), 88-95.
- Emamghoreishi, M., Khasaki, M. ve Aazam, M.F. (2005). *Coriandrum sativum*: Evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *J. Ethnopharmacol.*, 96(3), 365-370.
- Euston, S.R., Finnigan, S.R. ve Hirst, R.L. (2000). Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocoll.*, 14(2), 155-161.

- Eur.Ph.9.0, (2016). European Pharmacopoeia, Ninth Edition, Council of Europe, Strasbourg.
- Falco, J.W., Walker, R.D. ve Shah, D.O. (1974). Effect of phase-volume ratio and phase-inversion on viscosity of microemulsions and liquid crystals. *AIChE Journal*, 20(3), 510-514.
- Faixova, Z. ve Faix, S. (2008). Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *Folia Vet.*, 52(3-4), 135-139.
- Fang, J.Y., Yu, S.Y., Wu, P.C., Huang, Y.B., Tsai, Y.H. (2001). *In vitro* skin permeation of estradiol from various proniosome formulations. *Int. J. Pharm.*, 215(1-2), 91-99.
- Filiptsova, O.V., Gazzavi-Rogozina, L.V., Timoshyna, I.A., Naboka, O.I., Dyomina, Y. V., Ochkur, A.V. (2018). The effect of the essential oils of lavender and rosemary on the human short-term memory. *Alexandria J. Med.*, 54(1), 41-44.
- Flanagan, J. ve Singh, H. (2006). Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food [Review]. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46(3), 221-237.
- Flint, O. (1994). *Food microscopy: a manual of practical methods, using optical microscopy* (Vol. 30). Oxford: BIOS Scientific.
- Flores, F.C., Ribeiro, R.F., Ourique, A.F., Rolim, C.M.B., Silva, C.D.B.D., Pohlmann, A. R., Beck, R.C.R., Guterres, S. S. (2011). Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quim. Nova*, 34(6), 968-972.
- Forgiarini, A., Esquena, J., Gonzalez, C., Solans, C. (2001). Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*, 17(7), 2076-2083.
- Franz, C. M. (2010). Essential oil research: Past, present and future. *Flavour Fragr. J.*, 25(3), 112-113.
- Fu, Z., Liu, M., Xu, J., Wang, Q., Fan, Z. (2010). Stabilization of water-in-octane nano-emulsion. Part I: Stabilized by mixed surfactant systems. *Fuel*, 89(10), 2838-2843.
- Gastón, M.S., Cid, M.P., Vázquez, A.M., Decarlíni, M.F., Demmel, G.I., Rossi, L.I., Aimar, M.L., Salvatierra, N.A. (2016). Sedative effect of central administration of *Coriandrum sativum* essential oil and its major component linalool in neonatal chicks. *Pharm. Biol.*, 54(10), 1954-1961.

- Genç, G. E. ve Özhatay, N. (2006). An ethnobotanical study in Çatalca (European part of İstanbul) II. *Turk. J. Pharm. Sci.*, 3(2), 73-89.
- Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2013-1). Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: Investigation of its bactericidal activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 13(1), 114-122.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N. (2013-2). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrason. Sonochem.*, 20(1), 338-344.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2013-3). Formulation and characterization of plant essential oil based nanoemulsion: Evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Asian J. Chem.*, 25, 321-323.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N. (2014). Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. *Colloids Surf. B*, 114, 392-397.
- Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E., Offen, D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: Current state. *Pharmacol. Rev.*, 54(2), 271-284.
- Gomes, N.G., Campos, M.G., Órfão, J.M., Ribeiro, C.A. (2009). Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33(8), 1372-1389.
- Goyal, A., Kumar, S., Nagpal, M., Singh, I., Arora, S. (2011). Potential of novel drug delivery systems for herbal drugs. *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, 45(3), 225-235.
- Grieve, M., 1971. Coriander. *A modern herbal: The medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folklore içinde* (221–222). New York: Dover Publications.
- Grumezescu, A. (2016). *Emulsions* (1. Ed.). USA: Academic Press.
- Gullapalli, R.P. ve Sheth, B.B. (1999). Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 48(3), 233-238.

- Guliani, A., Verma, M., Kumari, A., Acharya, A. (2021). Retaining the ‘essence’ of essential oil: Nanoemulsions of citral and carvone reduced oil loss and enhanced antibacterial efficacy via bacterial membrane perturbation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 61, 102243.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841.
- Güler, B., Kümüştekin, G. ve Uğurlu, E. (2015). Contribution to the traditional uses of medicinal plants of Turgutlu (Manisa–Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 176, 102-108.
- Güler, B., Manav, E. ve Uğurlu, E. (2015). Medicinal plants used by traditional healers in Bozüyük (Bilecik – Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 173, 39-47.
- Güven, K.C. (2012). Tıbbi Formüler İlaç Ansiklopedisi (1. Ed.). Nobel Tıp Kitabevleri.
- Güzel, Y., Güzelşemme, M. ve Miski, M. (2015). Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 174, 118-152.
- Haj, H. V., Ghannadi, A., & Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic effects of *Coriandrum sativum* L. in animal models. *J. Shahrekord Univ. Med. Sci.*, 5(2), 8-15.
- Han, M.İ. ve Bulut, G. (2015). The folk-medicinal plants of Kadisehri (Yozgat-Turkey). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 84(2), 237-248.
- Hashem, A.S., Awadalla, S.S., Zayed, G.M., Maggi, F., Benelli, G. (2018). *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum* – Insecticidal activity and mode of action. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(19), 18802-18812.
- Harwansh, R.K., Patra, K.C. ve Pareta, S.K. (2011). Nanoemulsion as potential vehicles for transdermal delivery of pure phytopharmaceuticals and poorly soluble drug. *Int. J. Drug Deliv.*, 3(2), 209-218.
- Hayta, S., Polat, R. ve Selvi, S. (2014). Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 154(3), 613-623.
- He, Q., Guo, M., Jin, T.Z., Arabi, S.A., Liu, D. (2021). Ultrasound improves the decontamination effect of thyme essential oil nanoemulsions against *Escherichia coli* O157: H7 on cherry tomatoes. *Int. J. Food Microbiol.*, 337, 108936.

- Hochmuth, D.H. (2008). MassFinder 4.0, Hochmuth Scientific Consulting. Hamburg, Germany.
- Hongratanaworakit, T. (2004). Physiological effects in aromatherapy. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(1), 117-125.
- Hongratanaworakit, T. (2009). Simultaneous aromatherapy massage with rosemary oil on humans. *Sci. Pharm.*, 77(2), 375-388.
- Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydr. Polym.*, 95(1), 50-56.
- Höferl, M., Krist, S. ve Buchbauer, G. (2006). Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress. *Planta Med.*, 72(13), 1188-1192.
- Hunter, R.J. (1986). *Foundations of Colloid Science* (1. Ed.). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Johnson, W., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J., Shank, R.C., Slaga, T. J., Snyder P. W, Andersen, F. A. (2011). Amended safety assessment of sesamum indicum (sesame) seed oil, hydrogenated sesame seed oil, sesamum indicum (sesame) oil unsaponifiables, and sodium sesameseedate. *Int. J. Toxicol.*, 30(3), 40-53.
- Kabalnov, A., Tarara, T., Arlauskas, R., Weers, J. (1996). Phospholipids as emulsion stabilizers: 2. Phase behavior versus emulsion stability. *J. Colloid Interface Sci.*, 184(1), 227-235.
- Kale, S.N. ve Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. *Syst. Rev. Pharm.*, 8(1), 39-47.
- Kamat, C.D., Gadgil, S., Mhatre, M., Williamson, K.S., Pye, Q.N., Hensley, K. (2008). Antioxidants in central nervous system diseases: Preclinical promise and translational challenges. *J. Alzheimer's Dis.*, 15(3), 473-493.
- Kaval, I., Behçet, L. ve Cakilcioglu, U. (2014). Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari-Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 155(1), 171-184.

- Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 9(2), 170-175.
- Keservani, R.K. ve Sharma, A.K. (2018). *Nanodispersions for Drug Delivery*. (1. Ed.). New York: Apple Academic Press.
- Kızıllarslan, Ç. Ve Özhatay, N. (2012). Wild plants used as medicinal purpose in the south part of İzmit (northwest Turkey). *Turkish J. Pharm. Sci.*, 9(2), 199-218.
- Kim, Y.H., Ghanem, A.H., Mahmoud, H., Higuchi, W. I. (1992). Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless mouse skin: Mechanism (s) of action. *Int. J. Pharm.*, 80(1-3), 17-31.
- Koçyiğit, M. ve Özhatay, N. (2006). Wild plants used as medicinal purpose in Yalova (Northwest Turkey). *Turkish J. Pharm. Sci.*, 3(2), 91-103.
- Kohlert, C., Schindler, G., März, R.W., Abel, G., Brinkhaus, B., Derendorf, H., Gräfe, E., Veit, M. (2002). Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, 42(7), 731-737.
- Kohlert, C., Van Rensen, I., März, R., Schindler, G., Graefe, E.U., Veit, M. (2000). Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta med.*, 66(06), 495-505.
- Komori, T., Matsumoto, T., Motomura, E., Shiroyama, T. (2006). The sleep-enhancing effect of valerian inhalation and sleep-shortening effect of lemon inhalation. *Chem. Senses*, 31(8), 731-737.
- Korkmaz, M. ve Karakuş, S. (2015). Traditional uses of medicinal plants of Üzümlü district, Erzincan, Turkey. *Pak. J. Bot.*, 47(1), 125-134.
- Korkmaz, M. ve Karakurt, E. (2014). Kelkit (Gümüşhane) aktarlarında satılan tıbbi bitkiler. *J. Nat. Appl. Sci.*, 18(3), 60-80.
- Kovar, K.A., Gropper, B., Friess, D., Ammon, H.P.T. (1987). Blood levels of 1,8-cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil. *Planta Med.*, 53(04), 315-318.

- Kumar, M., Misra, A., Babbar, A.K., Mishra, A.K., Mishra, P., Pathak, K. (2008). Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *Int. J. Pharm.*, 358(1-2), 285-291.
- Kumar, M., Pathak, K. ve Misra, A. (2009). Formulation and characterization of nanoemulsion-based drug delivery system of risperidone. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35(4), 387-395.
- Kumar, P. ve Mittal, K.L. (1999). *Handbook of micro emulsion science and technology*. (1. Ed.). New York: CRC Press.
- Kumar, S.H. ve Singh, V. (2012). Nanoemulsification-a novel targeted drug delivery tool. *J. Drug Deliv. Ther.*, 2(4), 40-45.
- Kumarasamy, Y., Fergusson, M.E., Nahar, L., Sarker, S.D. (2002). Bioactivity of moschamindole from *Centaurea moschata*. *Pharm. Biol.*, 40(4), 307-310.
- Kuroda, K., Inoue, N., Ito, Y., Kubota, K., Sugimoto, A., Kakuda, T., Fushiki, T. (2005). Sedative effects of the jasmine tea odor and I(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states. *Eur. J. Appl. Physiol.* 95(2-3), 107-114.
- Kültür, Ş. (2014). Medicinal plant recipes from Kırklareli. *J. Pharm. Istanbul Univ.*, 44(1), 63-68.
- Landry, K.S., Chang, Y., McClements, D.J., McLandsborough, L. (2014). Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157: H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 187, 15-21.
- Lawrence, M.J. ve Rees, G.D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 175-193.
- Li, G., Zhang, Z., Liu, H., Hu, L. (2021). Nanoemulsion-based delivery approaches for nutraceuticals: fabrication, application, characterization, biological fate, potential toxicity and future trends. *Food Function*, 12(5), 1933-1953.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhong, F., Huang, Q. (2012). Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *J. Agric. Food Chem.* 60(30), 7548-7555.

- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum 99rubic99us* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.*, 112(1), 77-83.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60(15), 1650-1662.
- Lovelyn, C. ve Attama, A. A. (2011). Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, 2(05), 626-639.
- Lucas, S.M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.*, 147(S1), S232-S240.
- Lv, Y., Yang, F., Li, X., Zhang, X., Abbas, S. (2014). Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum 99rubic based complex coacervation. *Food Hydrocoll.*, 35, 305-314.
- Maali, A. ve Mosavian, M. H. (2013). Preparation and application of nanoemulsions in the last decade (2000–2010). *J. Dispers. Sci. Technol.*, 34(1), 92-105.
- Malvern. (2011). Dynamic Light Scattering Common Terms Defined, *Malvern Instruments Limited*, 2-5.
- Mancianti, F. ve Ebani, V. V. (2020). Biological activity of essential oils. *Molecules*, 25(3), 678.
- Mandal, S. ve Mandal, M. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 5(6), 421-428.
- Manev, H., Chen, H., Dzitoyeva, S., Manev, R. (2011). Cyclooxygenases and 5-lipoxygenase in Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35(2), 315-319.
- Mani, V. ve Parle, M. (2009). Memory-enhancing activity of *Coriandrum sativum* in rats. *Pharmacologyonline*, 2, 827-839.
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M. (2006). Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J. Condens. Matter Phys.*, 18(41), 635-666.

- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.*, 103(3), 778-786.
- McClements, D.J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (2. Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- McClements, D.J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 1, 241-269.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft matter*, 7(6), 2297-2316.
- McClements, D.J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8(6), 1719-1729.
- McClements, D. J. (2021). Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. *Prog. Lipid Res.*, 81, 101081.
- McClements, D.J. ve Dungan, S.R. (1993). Factors that affect the rate of oil exchange between oil-in-water emulsion droplets stabilized by a nonionic surfactant: Droplet size, surfactant concentration, and ionic strength. *Am. J. Phys. Chem.*, 97(28), 7304-7308.
- McClements, D.J. ve Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. [Review]. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51(4), 285-330.
- McClements, D.J. ve Xiao, H. (2012). Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics. *Food Funct.*, 3(3), 202-220.
- McLafferty, F.W. ve Stauffer, D.B. (1989). *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. New York: J Wiley and Sons.
- Mehnert, W. ve Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 83-101.
- Mendes, F.R., Negri, G., Duarte-Almeida, J.M., Tabach, R., Carlini, E.A. (2012). The action of plants and their constituents on the central nervous system. V. Cechinel-Filho (Editör), *Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives* içinde (161). John Wiley & Sons.

- Mili, A., Das, S., Nandakumar, K., Lobo, R. (2021). A comprehensive review on *Sesamum indicum* L.: Botanical, ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological aspects. *J. Ethnopharmacol.*, 5(281), 114503.
- Milica, A., Mirjana, C. ve Jovana, S. (2016) Effect of weather conditions, location and fertilization on coriander fruit essential oil quality. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 19(5), 1208-1215.
- Miraldi, E., Giachetti, D., Mazzoni, G., Biagi, M. (2010). Quali-quantitative analysis of eight *Rosmarinus officinalis* essential oils of different origin. First report. *JSAS*, 2(1), 42-43.
- Mistry, A., Stolnik, S. ve Illum, L. (2009). Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.*, 379(1), 146-157.
- Mitri, K., Vauthier, C., Huang, N., 101rabi, A., Ringard-Lefebvre, C., Anselmi, C., Stambouli, M., Rosilio, V., Vachon, J., Bouchemal, K. (2012). Scale-up of nanoemulsion produced by emulsification and solvent diffusion. *J. Pharm. Sci.*, 101(11), 4240-4247.
- Morales, D., Gutiérrez, J.M., Garcia-Celma, M.J., Solans, Y.C. (2003). A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. *Langmuir*, 19(18), 7196-7200.
- Moulik, S. P. ve Paul, B. K. (1998). Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 78(2), 99-195.
- Musthaba, S.M., Baboota, S., Ahmed, S., Ahuja, A., Ali, J. (2009). Status of novel drug delivery technology for phytotherapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 6(6), 625-637.
- Mükemre, M., Behçet, L. ve Çakılcıoğlu, U. (2015). Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van-Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 166, 361-374.
- Natarajan, S., Shunmugiah, K. P. ve Kasi, P. D. (2013). Plants traditionally used in age-related brain disorders (dementia): An ethanopharmacological survey. *Pharm. Biol.*, 51(4), 492-523.
- Navayan, A., Moghimipour, E., Khodayar, M.J., Vazirianzadeh, B., Siahpoosh, A., Valizadeh, M., Mansourzadeh, Z. (2017). Evaluation of the mosquito repellent

- activity of nano-sized microemulsion of *Eucalyptus globulus* essential oil against culicinae. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, 12(4), e55626.
- Neiryneck, N., Van Der Meeren, P., Gorbe, S. B., Dierckx, S., Dewettinck, K. (2004). Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocoll.*, 18(6), 949-957.
- Nii, T. ve Ishii, F. (2004). Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers. *Colloids Surf. B*, 39(1-2), 57-63.
- Ochekpe, N.A., Olorunfemi, P O. ve Ngwuluka, N.C. (2009). Nanotechnology and drug delivery part 1: Background and applications. *Trop. J. Pharm. Res.*, 8(3), 265-274.
- Oliver, J. E. (2003). (S)(+)-Linalool from oil of coriander. *J. Essent. Oil Res.*, 15(1), 31-33.
- Onodera, T., Kuriyama, I., Andoh, T., Ichikawa, H., Sakamoto, Y., Lee-Hiraiwa, E., Mizushina, Y. (2015). Influence of particle size on the in vitro and in vivo anti-inflammatory and anti-allergic activities of a curcumin lipid nanoemulsion. *Int. J. Mol. Med.*, 35(6), 1720-1728.
- Oray, A., Arak, E. ve Raal, A. (2011) Essential Oil Composition of *Coriandrum sativum* L. fruits from different countries, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 14(1), 118-123.
- Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Şener, B., Başer, K. H. C. (2008). Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chem.*, 108(2), 663-668.
- Özdemir, E. ve Alpınar, K. (2015). An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde – Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 166, 53-65.
- Pangeni, R., Sharma, S., Mustafa, G., Ali, J., Baboota, S. (2014). Vitamin E loaded resveratrol nanoemulsion for brain targeting for the treatment of Parkinson's disease by reducing oxidative stress. *Nanotechnology*, 25(48), 485102.
- Pardridge, W.M. (1999). Non-invasive drug delivery to the human brain using endogenous blood – brain barrier transport systems. *Pharmaceut. Sci. Tech. Today*, 2(2), 49-59.

- Patel, S., Chavhan, S., Soni, H., Babbar, A.K., Mathur, R., Mishra, A.K., Sawant, K. (2011). Brain targeting of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles by intranasal route. *J. Drug Target.*, 19(6), 468-474.
- Peng, L.C., Liu, C.H., Kwan, C.C., Huang, K.F. (2010). Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 370(1-3), 136-142.
- Phillis, J.W., Horrocks, L.A. ve Farooqui, A. A. (2006). Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res. Rev.*, 52(2), 201-243.
- Piorkowski, D.T. ve McClements, D.J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocoll.*, 42, 5-41.
- Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., Falcão, A. (2009). Intranasal drug delivery: How, why and what for?. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 12(3), 288-311.
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Satıl, F. (2013). Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl—Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 148(3), 951-963.
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Kaltalioglu, K., Ulasan, M. D., Türkmen, Z. (2015). An ethnobotanical study on medicinal plants in Espiye and its surrounding (Giresun-Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 163, 1-11.
- Polat, R. ve Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 139(2), 626-641.
- Prince, L. M. (1977). *Microemulsions: theory and practice* (1. Ed.). Academic Press.
- Prow, T.W., Grice, J.E., Lin, L.L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., Wurm, E.M.T., Yoong, C., Robertson, T.A., Soyer, H.P., Roberts, M. S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63(6), 470-491.
- Pusadkar, P.P., Kokiladevi, E., Bonde, S.V., Mohite, N.R. (2015). Sesame (*Sesamum indicum* L.) importance and its high quality seed oil: A review. *Trends Biosci.*, 8(15), 3900-3906.

- Rao, J. ve McClements, D.J. (2012-1). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocoll.*, 26(1), 268-276.
- Rao, J. ve McClements, D.J. (2012-2). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocoll.*, 29(2), 326-334.
- Ray, A.K., Bird, P.B., Iacobucci, G.A., Clark Jr, B.C. (1995). Functionality of gum 104rubic. Fractionation, characterization and evaluation of gum fractions in citrus oil emulsions and model beverages. *Food Hydrocoll.*, 9(2), 123-131.
- Robins, M.M. (2000). Lipid emulsions. *Grasas Y Aceites*, 51(1-2), 26-34.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P. (2010). Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine*, 5(2), 287-306.
- Sağiroğlu, M., Dalgıccedil, S. ve Toksoy, S. (2013). Medicinal plants used in Dalaman (Muğla), Turkey. *J. Med. Plant Res.*, 7(28), 2053-2066.
- Samojlik, I., Lakic, N., Mimica-Dukic, N., Đaković-Švajcer, K., Bozin, B. (2010). Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 58(15), 8848-8853.
- Sánchez, C.C. ve Patino, J.M.R. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocoll.*, 19(3), 407-416.
- Saraç, D.U., Özkan, Z.C. ve Akbulut, S. (2013). Ethnobotanic features of Rize/Turkey province. *BioDiCon*, 6(3), 57-66.
- Saraf, S. (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*, 81(7), 680-689.
- Saranya, S., Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A. (2012). Antibacterial activity of eucalyptus oil nanoemulsion against *Proteus mirabilis*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4(3), 668-671.

- Sargın, S.A. (2015). Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazı district of Mersin, Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 173, 105-126.
- Sargın, S.A., Akçicek, E. ve Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 150(3), 860-874.
- Sargın, S.A., Selvi, S. ve López, V. (2015-1). Ethnomedicinal plants of Sarigöl district (Manisa), Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 171, 64-84.
- Sargın, S.A., Selvi, S. ve Büyükcengiz, M. (2015-2). Ethnomedicinal plants of Aydıncık district of Mersin, Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, 174, 200-216.
- Sarı, A.O. (2010). Ege ve Güney Marmara bölgelerinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler. *Anadolu ETAE*, 20(2), 1-21.
- Sayorwan, W., Siripornpanich, V., Hongratanaworakit, T., Kotchabhakdi, N., Ruangrunsi, N. (2013). The effects of jasmine oil inhalation on brain wave activities and emotions. *J. Health Res.*, 27(2), 73-77.
- Sayorwan, W., Ruangrunsi, N., Piriapornpanich, T., Hongratanaworakit, T., Kotchabhakdi, N., Siripornpanich, V. (2012). Effects of inhaled rosemary oil on subjective feelings and activities of the nervous system. *Sci. Pharm.*, 81(2), 531-542.
- Schneider, M., Stracke, F., Hansen, S., Schaefer, U.F. (2009). Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendocrinol.*, 1(4), 197-206.
- Setya, S., Talegaonkar, S., Razdan, B. K. (2014). Nanoemulsions: Formulation methods and stability aspects. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 3(2), 2214-2228.
- Shah, B., Davidson, P.M. ve Zhong, Q. (2012). Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions. *LWT – Food Sci. Technol.*, 49(1), 139-148.
- Shah, B., Ikeda, S., Davidson, P.M., Zhong, Q. (2012). Nanodispersing thymol in whey protein isolate-maltodextrin conjugate capsules produced using the emulsion – evaporation technique. *J. Food Eng.*, 113(1), 79-86.
- Shah, L., Yadav, S. ve Amiji, M. (2013). Nanotechnology for CNS delivery of bio-therapeutic agents. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 3(4), 336-351.

- Shah, P., Bhalodia, D., Shelat, P. (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Syst. Rev. Pharm.*, 1(1), 24-32.
- Shen, Q., Wang, Y. ve Zhang, Y. (2011). Improvement of colchicine oral bioavailability by incorporating eugenol in the nanoemulsion as an oil excipient and enhancer. *Int. J. Nanomedicine*, 6, 1237-1243.
- Silva, A.P., Nunes, B.R., De Oliveira, M.C., Koester, L.S., Mayorga, P., Bassani, V.L., Teixeira, H.F. (2009). Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, 64(1), 32-35.
- Singh, K., Ahmad, Z., Shakya, P., Ansari, V.A., Kumar, A., Zishan, M., Arif, M. (2016). Nano formulation: A novel approach for nose to brain drug delivery. *J. Chem. Pharm. Res.*, 8(2), 208-215.
- Singhal, A.K., Naithani, V. ve Bangar, O.P. (2012). Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.*, 2(2), 84-91.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J. (2005). Nanoemulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 10(3-4), 102- 110.
- Sood, S., Jain, K. ve Gowthamarajan, K. (2014). Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. *Colloids Surf. B*, 113, 330-337.
- Soreq, H. ve Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase – New roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 294–302.
- Strous, R. D. ve Shoenfeld, Y. (2006). To smell the immune system: Olfaction, autoimmunity and brain involvement. *Autoimmun. Rev.*, 6(1), 54-60.
- Sugawara, Y., Hara, C., Tamura, K., Fujii, T., Nakamura, K. I., Masujima, T., Aoki, T. (1998). Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Anal. Chim. Acta*, 365(1-3), 293-299.
- Sugumar, S., Clarke, S.K., Nirmala, M.J., Tyagi, B.K., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2014-1). Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bull. Entomol. Res.*, 104(3), 393-402.

- Sugumar, S., Ghosh, V., Nirmala, M.J., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2014-2). Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrason. Sonochem.*, 21(3), 1044-1049.
- Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshiro, Y. (1994). Traditional medicine in Turkey III. Folk medicine in East Anatolia, Van and Bitlis provinces. *Int. J. Pharmacogn.*, 32(1), 3-12.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 108-109(0), 303- 318.
- Takamura, A., Minowa, T., Noro, S., Kubo, T. (1979). Effects of Tween and Span group emulsifiers on the stability of O/W emulsions. *Chem. Pharm. Bull.*, 27(12), 2921-2926.
- Tamilvanan, S. (2004). Review article submicron emulsions as a carrier for topical (ocular and percutaneous) and nasal drug delivery. *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, 38(2), 73-80.
- Tanojo, H., Junginger, H.E. ve Boddé, H.E. (1997). *In vivo* human skin permeability enhancement by oleic acid: Transepidermal water loss and fourier-transform infrared spectroscopy studies. *J. Control. Release*, 47(1), 31-39.
- Tappel, A.L. (1962). [71] Lipoxidase. S.P. Colowick ve N.O. Kaplan (Editörler), *Methods in enzymology* içinde (539-542). New York: Academic Press.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind. Crops Prod.*, 43, 587-595.
- Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., Weiss, J. (2012). Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food Funct.*, 3(3), 290-301.
- Tetik, F., Civelek, S., Cakilcioglu, U. (2013). Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 146(1), 331-346.
- Thorat, S. (2016). Formulation and product development of nasal spray: An overview. *Sch. J. Appl. Med. Sci.*, 4, 2976-2985.

- Tuzlacı, E. ve Şenkardeş, İ. (2011). Turkish folk medicinal plants, X: Ürgüp (Nevşehir). *Marmara Pharm. J.*, 15(2), 58-68.
- Tuzlacı, E., İşbilen, D.A., Bulut, G. (2010). Turkish folk medicinal plants, VIII: Lalapaşa (Edirne). *Marmara Pharm. J.*, 14(1), 47-52.
- Wani, T.A., Masoodi, F.A., Jafari, S.M., McClements, D.J. (2018). Chapter 19 -Safety of nanoemulsions and their regulatory status. S.M. Jafari ve D.J. McClements (Editörler), *Nanoemulsions* içinde (613-628). New York: Academic Press.
- Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y.W., Huang, M.T., Ho, C.T., Huang, Q. (2008). Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chem.*, 108(2), 419-424.
- Woranuch, S. ve Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydr. Polym.*, 96(2), 578-585.
- Wang, Y. (2014). *Preparation of nano-and microemulsions using phase inversion and emulsion titration methods: A thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Food Technology at Massey University, Auckland, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).
- Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., Moustaid-Moussa, N. (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *J. Nutr. Biochem.*, 25(4), 363-376.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.*, 108(3), 1019-1022.
- Wangensteen, H., Samuelsen, A.B., Malterud, K.E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.*, 88(2), 293-297.
- Were, B.A., Onkware, A.O., Gudu, S., Welander, M., Carlsson, A.S. (2006). Seed oil content and fatty acid composition in East African sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions evaluated over 3 years. *Field Crops Res.*, 97(2-3), 254-260.
- Wong, D.W., Camirand, W.M., Pavlath, A.E., Parris, N., Friedman, M. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36(8), 807-844.

- Wright, J. (1991). Essential oils. P. R. Ashurst (editor), *Food flavorings* içinde (25-57). Boston: Springer.
- Vilasau, J., Solans, C., Gómez, M. J., Dabrio, J., Mújika-Garai, R., Esquena, J. (2011). Phase behaviour of a mixed ionic/nonionic surfactant system used to prepare stable oil-in-water paraffin emulsions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 384(1-3), 473-481.
- Valenti, D., De Logu, A., Loy, G., Sinico, C., Bonsignore, L., Cottiglia, F., Garau, D., Fadda, A.M. (2001). Liposome-incorporated Santolina insularis essential oil: Preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J. Liposome Res.*, 11(1), 73-90.
- Vilasau, J., Solans, C., Gómez, M. J., Dabrio, J., Mújika-Garai, R., Esquena, J. (2011). Phase behaviour of a mixed ionic/nonionic surfactant system used to prepare stable oil-in-water paraffin emulsions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 384(1-3), 473-481.
- Vishal, V., Sharma, G.N., Mukesh, G., Ranjan, B. (2014). A review on some plants having anti-inflammatory activity. *J. Phytopharm.*, 2, 214-221.
- Vyas, T.K., Shahiwala, A., Amiji, M.M. (2008). Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int. J. Pharm.*, 347(1), 93-101.
- Xing, C., Yuan, X., Wu, X., Shao, X., Yuan, J., Yan, W. (2019). Chemometric classification and quantification of sesame oil adulterated with other vegetable oils based on fatty acids composition by gas chromatography. *LWT*, 108, 437-445.
- Yermanos, D.M., Hemstreet, S., Saleeb, W., Huszar, C. K. (1972). Oil content and composition of the seed in the world collection of sesame introductions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49(1), 20-23.
- Zhang, S., Zhang, M., Fang, Z., Liu, Y. (2017). Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. *LWT*, 75, 316-322.
- Zhang, Y., Niu, Y., Luo, Y., Ge, M., Yang, T., Yu, L.L., Wang, Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food chem.*, 142, 269-275.

- Zhao, H., Lu, H., Gong, T., Zhang, Z. (2013). Nanoemulsion loaded with lycobetaine–oleic acid ionic complex: Physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity. *Int. J. Nanomedicine*, 8, 1959-1973.
- Zhao, L., Zhu, Z., Ma, L., Li, Y. (2020). O/W nanoemulsion as an adjuvant for an inactivated H3N2 influenza vaccine: Based on particle properties and mode of carrying. *Int. J. Nanomedicine*, 15, 2071-2083.
- Zhao, Y., Wang, C., Chow, A.H., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., Zheng, Y. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies. *Int. J. Pharm.*, 383(1-2), 170-177.
- Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D. J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 59(11), 6247-6255

## **EKLER**

**EK 1.** Avrupa Farmakopesi 9.0, *Coriandrum sativum* L. (Kışniş) uçucu yağı, *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye) uçucu yağı, *Sesamum indicum* L. (Susam) yağı

**EK 2.** Emülsiyonların karakterizasyon ölçüm tabloları

**EK 3.** Emülsiyonların zeta boyut analiz spektrumları



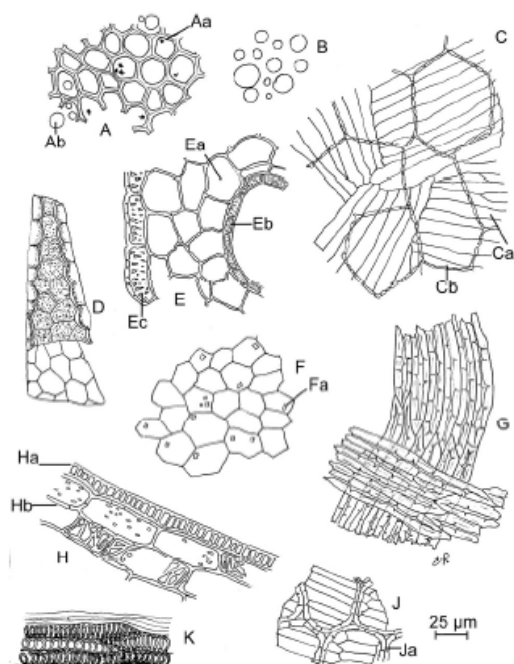


Figure 1304.-1. – Illustration for identification test B of powdered herbal drug of coriander

#### TESTS

**Foreign matter** (2.8.2). It complies with the test. None of the cremocarps show perforations due to insects.

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 10.0 per cent, determined on 1.000 g of the powdered herbal drug (355) (2.9.12) by drying in an oven at 105 °C for 2 h.

**Total ash** (2.4.16): maximum 8.0 per cent.

#### ASSAY

**Essential oil** (2.8.12). Use a 500 mL round-bottomed flask, 200 mL of water R as the distillation liquid and 0.5 mL of xylene R in the graduated tube. Reduce the herbal drug to a coarse powder and immediately use 30.0 g for the determination. Distil at a rate of 2–3 mL/min for 2 h.



07/2014:1820

## CORIANDER OIL

### Coriandri aetheroleum

#### DEFINITION

Essential oil obtained by steam distillation from the fruits of *Coriandrum sativum* L.

#### CHARACTERS

**Appearance:** clear, colourless or pale yellow liquid.

#### IDENTIFICATION

**First identification:** B.

**Second identification:** A.

**A. Examine by thin-layer chromatography** (2.2.27).

**Test solution.** Dissolve 10 µL of the substance to be examined in 1.0 mL of toluene R.

**Reference solution.** Dissolve 10 µL of linalol R and 2 µL of geranyl acetate R in 1.0 mL of toluene R.

**Plate:** TLC silica gel F<sub>254</sub> plate R (5–40 µm) [or TLC silica gel F<sub>254</sub> plate R (2–10 µm)].

**Mobile phase:** ethyl acetate R, toluene R (5:95 V/V).

**Application:** 10 µL [or 2 µL] as bands of 15 mm [or 8 mm].

**Development:** over a path of 10 cm [or 6 cm].

**Drying:** in air for 5 min.

**Detection:** treat with anisaldehyde solution R and heat at 100–105 °C for 5 min; examine in daylight.

**Results:** see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution. Furthermore, other faint zones may be present in the chromatogram obtained with the test solution.

| Top of the plate                    |                                                        |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                                     | A bluish-violet zone                                   |
| Geranyl acetate: a violet-blue zone |                                                        |
| Linalol: an intense violet zone     | An intense violet zone (linalol)<br>A violet-blue zone |
| Reference solution                  | Test solution                                          |

**B. Examine the chromatograms** obtained in the test for chromatographic profile.

**Results:** the characteristic peaks in the chromatogram obtained with the test solution are similar in retention time to those in the chromatogram obtained with the reference solution.

#### TESTS

**Relative density** (2.2.5): 0.860 to 0.880.

**Refractive index** (2.2.6): 1.462 to 1.470.

**Optical rotation** (2.2.7): +7° to +13°.

**Acid value** (2.5.1): maximum 3.0, determined on 5.00 g of the substance to be examined.

**Chromatographic profile.** Gas chromatography (2.2.28): use the normalisation procedure.

**Test solution.** The substance to be examined.

**Reference solution (a).** Dissolve 10 µL of α-pinene R, 10 µL of limonene R, 10 µL of γ-terpinene R, 10 µL of p-cymene R, 10 mg of camphor R, 20 µL of linalol R, 10 µL of α-terpineol R, 10 µL of geranyl acetate R and 10 µL of geraniol R in 1 mL of heptane R.

**Reference solution (b).** Dissolve 5 µL of geraniol R in heptane R and dilute to 10 mL with the same solvent.

**Column:**

- **material:** fused silica;
- **size:** l = 60 m, Ø = 0.25 mm;
- **stationary phase:** macrogol 20 000 R (film thickness 0.25 µm).

**Carrier gas:** helium for chromatography R.

**Flow rate:** 1 mL/min.

**Split ratio:** 1:65.

**Temperature:**

|                | Time<br>(min) | Temperature<br>(°C) |
|----------------|---------------|---------------------|
| Column         | 0 - 10        | 60                  |
|                | 10 - 75       | 60 → 190            |
|                | 75 - 120      | 190                 |
| Injection port |               | 220                 |
| Detector       |               | 240                 |

**Detection:** flame ionisation.

**Injection:** 0.2 µL.

**Elution order:** order indicated in the composition of reference solution (a). Record the retention times of these substances.

**System suitability:** reference solution (a):

- **resolution:** minimum 1.5 between the peaks due to linalol and camphor.

Using the retention times determined from the chromatogram obtained with reference solution (a), locate the components of reference solution (a) in the chromatogram obtained with the test solution.

Determine the percentage content of each of these components. The percentages are within the following ranges:

- **α-pinene:** 3.0 per cent to 7.0 per cent;
- **limonene:** 1.5 per cent to 5.0 per cent;
- **γ-terpinene:** 1.5 per cent to 8.0 per cent;
- **p-cymene:** 0.5 per cent to 4.0 per cent;
- **camphor:** 3.0 per cent to 6.0 per cent;
- **linalol:** 65.0 per cent to 78.0 per cent;

- **geranyl acetate:** 0.5 per cent to 4.0 per cent;
- **geraniol:** 0.5 per cent to 3.0 per cent;
- **disregard limit:** area of the peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent).

**Chiral purity.** Gas chromatography (2.2.28).

**Test solution.** Dissolve 0.02 g of the substance to be examined in pentane R and dilute to 10 mL with the same solvent.

**Reference solution.** Dissolve 10 µL of linalol R and 5 mg of borneol R in pentane R and dilute to 10 mL with the same solvent.

**Column:**

- **material:** fused silica;
- **size:** l = 25 m, Ø = 0.25 mm;
- **stationary phase:** modified β-cyclodextrin for chiral chromatography R (film thickness 0.25 µm).

**Carrier gas:** helium for chromatography R.

**Flow rate:** 1.3 mL/min.

**Split ratio:** 1:30.

**Temperature:**

|                | Time<br>(min) | Temperature<br>(°C) |
|----------------|---------------|---------------------|
| Column         | 0 - 65        | 50 → 180            |
| Injection port |               | 230                 |
| Detector       |               | 230                 |

**Detection:** flame ionisation.

**Injection:** 1 µL.

**System suitability:** reference solution:

- **resolution:** minimum 5.5 between the peaks due to (R)-linalol (1<sup>st</sup> peak) and (S)-linalol (2<sup>nd</sup> peak) and minimum 2.9 between the peaks due to (S)-linalol and borneol (3<sup>rd</sup> peak).

**Limit:** calculate the percentage content of (R)-linalol using the expression:

$$\frac{A_R}{A_S + A_R} \times 100$$

A<sub>S</sub> = area of the peak due to (S)-linalol;

A<sub>R</sub> = area of the peak due to (R)-linalol.

- **(R)-linalol:** maximum 14 per cent.

**STORAGE**

At a temperature not exceeding 25 °C.



04/2011:1306

**COUCH GRASS RHIZOME****DEFINITION**

Whole or cut, washed and dried rhizome of *Agropyron repens* (L.) P.Beauv. (*Elymus repens* (L.) Gould); the adventitious roots are removed.

**IDENTIFICATION**

- The shiny yellowish, light brown or yellowish-brown pieces of the rhizome are 2-3 mm thick and longitudinally furrowed. At the nodes are the remains of very thin, more or less branched roots and whitish or brownish scale-like leaves; the internodes, up to 6 cm long, are furrowed and hollow inside. The transverse section of the nodes shows a yellowish medulla.
- Microscopic examination (2.8.23).** The powder is whitish-yellow. Examine under a microscope using *chloral hydrate solution R*. The powder shows the following diagnostic characters (Figure 1306.-1): fragments of the epidermis (surface view [A]) covered with a thick cuticle and composed of rectangular and elongated, thick-walled cells with pitted, slightly wavy walls, which usually alternate with small, thin-walled, rounded or almost square twin cells; fragments (transverse section [B]) showing the epidermis [Ba] associated with thick-walled cells of the hypodermis; fragments in transverse section [F] consisting of endodermic cells with U-shaped thickening of the walls [Fa] accompanied by pericyclic fibres [Fb]; numerous fragments of moderately thickened fibres [C]; groups of vessels [D, G] with slit-shaped pits [Da] or with spiral and annular thickening [Ga], accompanied by fibres [Db, Gb]; numerous fragments of the cortical parenchyma and the pith with slightly thickened and pitted cells [E].

underlying hypodermis composed of large, irregular cells with thickened and beaded anticlinal walls [Fb]; fragments of the lamina (transverse section [G]), showing the epidermis covered by a very thick cuticle [Ga], hypodermal cells extending across the mesophyll [Gb] at intervals, separating 1 or 2 layers of palisade parenchyma into large, crescent-shaped areas [Gc]; glandular trichomes of 2 types, the majority with a short, unicellular stalk and a radiate head composed of 8 cells (surface view [E], side view [H]), others, less abundant, with a uni- or bicellular stalk and a spherical, unicellular head [Ja, K].

C. Thin-layer chromatography (2.2.27).

**Test solution.** Dissolve 20 µL of the oil obtained in the assay in 1 mL of hexane R.

**Reference solution.** Dissolve 5 mg of borneol R, 5 mg of bornyl acetate R and 10 µL of cineole R in 1 mL of hexane R.

**Plate:** TLC silica gel plate R.

**Mobile phase:** ethyl acetate R, toluene R (5:95 V/V).

**Application:** 10 µL as bands.

**Development:** over a path of 15 cm.

**Drying:** in air.

**Detection:** treat with anisaldehyde solution R, heat at 100–105 °C for 10 min and examine in daylight.

**Results:** see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution.

| Top of the plate                       |                                                                                           |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bornyl acetate: a yellowish-brown zone | A red zone<br>A yellowish-brown zone of low intensity<br>A coloured zone of low intensity |
| Reference solution                     | Test solution                                                                             |

D. Thin-layer chromatography (2.2.27).

**Test solution.** Grind 1.0 g of the herbal drug in 10 mL of methanol R and filter.

**Reference solution.** Dissolve 1.0 mg of caffeic acid R and 5.0 mg of rosmarinic acid R in 10 mL of methanol R.

**Plate:** TLC silica gel plate R.

**Mobile phase:** anhydrous formic acid R, acetone R, methylene chloride R (8.5:25:85 V/V/V).

**Application:** 10 µL of the test solution and 20 µL of the reference solution, as bands.

**Development:** over a path of 8 cm.

**Drying:** in air.

**Detection:** examine in ultraviolet light at 365 nm.

**Results:** see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution.

| Top of the plate                                                                              |                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Caffeic acid: a light blue fluorescent zone<br>Rosmarinic acid: a light blue fluorescent zone | A pink fluorescent zone<br>A blue fluorescent zone of low intensity<br>An intense light blue fluorescent zone |
| Reference solution                                                                            | Test solution                                                                                                 |

## TESTS

**Foreign matter** (2.8.2): maximum 5 per cent of stems and maximum 2 per cent of other foreign matter.

**Water** (2.2.13): maximum 100 mL/kg, determined on 20.0 g of the powdered herbal drug (355) (2.9.12).

**Total ash** (2.4.16): maximum 9.0 per cent.

## ASSAY

### Total hydroxycinnamic derivatives

**Stock solution.** To 0.200 g of the powdered herbal drug (355) (2.9.12) add 80 mL of ethanol (50 per cent V/V) R. Boil in a water-bath under a reflux condenser for 30 min. Allow to cool and filter. Rinse the filter with 10 mL of ethanol (50 per cent V/V) R. Combine the filtrate and the rinsings in a volumetric flask and dilute to 100.0 mL with ethanol (50 per cent V/V) R.

**Test solution.** To 1.0 mL of the stock solution add 2 mL of 0.5 M hydrochloric acid, 2 mL of a solution prepared by dissolving 10 g of sodium nitrite R and 10 g of sodium molybdate R in 100 mL of water R, and then add 2 mL of dilute sodium hydroxide solution R and dilute to 10.0 mL with water R; mix.

**Compensation solution.** Dilute 1.0 mL of the stock solution to 10.0 mL with water R.

Measure immediately the absorbance (2.2.25) of the test solution at 505 nm.

Calculate the percentage content of total hydroxycinnamic derivatives, expressed as rosmarinic acid, using the following expression:

$$\frac{A \times 2.5}{m}$$

i.e. taking the specific absorbance of rosmarinic acid to be 400.

A = absorbance of the test solution at 505 nm;

01/2008:1846



## ROSEMARY OIL

### Rosmarini aetheroleum

## DEFINITION

Essential oil obtained by steam distillation from the flowering aerial parts of *Rosmarinus officinalis* L.

## CHARACTERS

**Appearance:** clear, mobile, colourless or pale yellow liquid.

**Characteristic odour.**

## IDENTIFICATION

**First identification:** B.

**Second identification:** A.

### A. Thin-layer chromatography (2.2.27).

**Test solution.** Dissolve 0.5 mL of the substance to be examined in toluene R and dilute to 10 mL with the same solvent.

**Reference solution.** Dissolve 50 mg of borneol R, 50 mg of bornyl acetate R and 100 µL of cineole R in toluene R and dilute to 10 mL with the same solvent.

**Plate:** TLC silica gel plate R.

**Mobile phase:** ethyl acetate R, toluene R (5:95 V/V).

**Application:** 10 µL, as bands.

**Development:** over a path of 15 cm.

**Drying:** in air.

**Detection:** spray the plate with *vanillin reagent R* and heat the plate at 100–105 °C for 10 min. Examine immediately in daylight.

**Results:** see below the sequence of the zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution. Furthermore, several violet-blue to violet-grey zones of medium intensity (terpene alcohols) are present in the lower third of the chromatogram obtained with the test solution.

| Top of the plate                                    |                                                      |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                                                     | An intense violet zone                               |
|                                                     | A violet-grey zone                                   |
| Bornyl acetate: a bluish-grey zone of low intensity | A bluish-grey zone of low intensity (bornyl acetate) |
|                                                     | A violet-pink zone                                   |
| Cineole: an intense blue zone                       | An intense blue zone (cineole)                       |
| Borneol: a violet-blue zone of medium intensity     | A violet-blue zone of medium intensity (borneol)     |
| Reference solution                                  | Test solution                                        |

B. Examine the chromatograms obtained in the test for chromatographic profile.

**Results:** the characteristic peaks in the chromatogram obtained with the test solution are similar in retention time to those in the chromatogram obtained with the reference solution.

#### TESTS

**Relative density** (2.2.5): 0.895 to 0.920.

**Refractive index** (2.2.6): 1.464 to 1.473.

**Optical rotation** (2.2.7): – 5° to + 8°.

**Acid value** (2.5.1): maximum 1.0.

**Chromatographic profile.** Gas chromatography (2.2.28): use the normalisation procedure.

**Test solution.** Dissolve 0.20 mL of the substance to be examined in *hexane R* and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

**Reference solution.** Dissolve 20 µL of *α-pinene R*, 10 mg of *camphene R*, 20 µL of *β-pinene R*, 10 µL of *β-myrcene R*, 20 µL of *limonene R*, 50 µL of *cineole R*, 10 µL of *p-cymene R*, 50 mg of *camphor R*, 30 mg of *bornyl acetate R*, 10 mg of *α-terpineol R*, 10 mg of *borneol R* and 10 µL of *verbenone R* in *hexane R* and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

**Column:**

- **material:** fused silica,
- **size:**  $l = 30$  m (a film thickness of 1 µm may be used) to 60 m (a film thickness of 0.2 µm may be used),  $\varnothing = 0.25$ –0.53 mm,
- **stationary phase:** macrogol 20 000 R.

**Carrier gas:** helium for chromatography R.

**Flow rate:** 1 mL/min.

**Split ratio:** 1:50.

**Temperature:**

|                | Time (min) | Temperature (°C) |
|----------------|------------|------------------|
| Column         | 0 – 10     | 50               |
|                | 10 – 85    | 50 → 200         |
|                | 85 – 110   | 200              |
| Injection port |            | 200              |
| Detector       |            | 250              |

**Detection:** flame ionisation.

**Injection:** 1 µL.

**Elution order:** order indicated in the composition of the reference solution. Record the retention times of these substances.

**System suitability:** reference solution:

- **resolution:** minimum 1.5 between the peaks due to limonene and cineole and minimum 1.5 between the peaks due to *α-terpineol* and borneol.

Using the retention times determined from the chromatogram obtained with the reference solution, locate the components of the reference solution in the chromatogram obtained with the test solution.

Determine the percentage content of these components.

For rosemary oil, Spanish type, the percentages are within the following ranges:

- *α-pinene*: 18 per cent to 26 per cent,
- *camphene*: 8.0 per cent to 12.0 per cent,
- *β-pinene*: 2.0 per cent to 6.0 per cent,
- *β-myrcene*: 1.5 per cent to 5.0 per cent,
- *limonene*: 2.5 per cent to 5.0 per cent,
- *cineole*: 16.0 per cent to 25.0 per cent,
- *p-cymene*: 1.0 per cent to 2.2 per cent,
- *camphor*: 13.0 per cent to 21.0 per cent,
- *bornyl acetate*: 0.5 per cent to 2.5 per cent,
- *α-terpineol*: 1.0 per cent to 3.5 per cent,
- *borneol*: 2.0 per cent to 4.5 per cent,
- *verbenone*: 0.7 per cent to 2.5 per cent.

For rosemary oil, Moroccan and Tunisian type, the percentages are within the following ranges:

- *α-pinene*: 9.0 per cent to 14.0 per cent,
- *camphene*: 2.5 per cent to 6.0 per cent,
- *β-pinene*: 4.0 per cent to 9.0 per cent,
- *β-myrcene*: 1.0 per cent to 2.0 per cent,
- *limonene*: 1.5 per cent to 4.0 per cent,
- *cineole*: 38.0 per cent to 55.0 per cent,
- *p-cymene*: 0.8 per cent to 2.5 per cent,
- *camphor*: 5.0 per cent to 15.0 per cent,
- *bornyl acetate*: 0.1 per cent to 1.5 per cent,
- *α-terpineol*: 1.0 per cent to 2.6 per cent,
- *borneol*: 1.5 per cent to 5.0 per cent,
- *verbenone*: maximum 0.4 per cent.

#### STORAGE

At a temperature not exceeding 25 °C.

#### LABELLING

The label states that the content is Spanish type or Moroccan and Tunisian type.

**Test solution.** Dissolve 55.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase. Dilute 5.0 mL of this solution to 100.0 mL with the mobile phase.

**Reference solution.** Dissolve 55.0 mg of *sertraline hydrochloride* CRS in the mobile phase and dilute to 50.0 mL with the mobile phase. Dilute 5.0 mL of this solution to 100.0 mL with the mobile phase.

**Column:**

- size:  $l = 0.15$  m,  $\varnothing = 3.9$  mm;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (4  $\mu$ m);
- temperature: 30 °C.

**Mobile phase:** methanol R, buffer solution, acetonitrile R (15:40:45 V/V/V).

**Flow rate:** 1.8 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 254 nm.

**Injection:** 20  $\mu$ L.

**Run time:** twice the retention time of sertraline.

**Retention time:** sertraline = about 1.9 min.

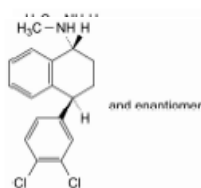
Calculate the percentage content of  $C_{17}H_{19}Cl_3N$  taking into account the assigned content of *sertraline hydrochloride* CRS.

#### STORAGE

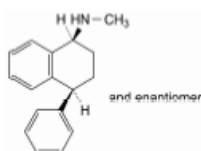
Protected from light.

#### IMPURITIES

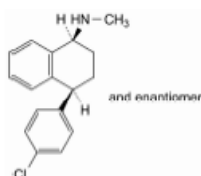
**Specified impurities:** A, B, C, D, E, F, G.



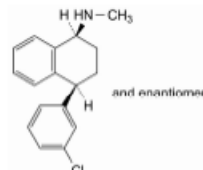
A. (1*R*,4*SR*)-4-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine,



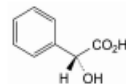
B. (1*R*,4*RS*)-*N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine,



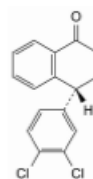
C. (1*R*,4*RS*)-4-(4-chlorophenyl)-*N*-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine,



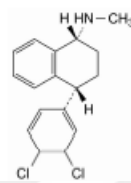
D. (1*R*,4*RS*)-4-(3-chlorophenyl)-*N*-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine,



E. (2*R*)-hydroxyphenylacetic acid ((*R*)-mandelic acid),



F. (4*R*)-4-(3,4-dichlorophenyl)-3,4-dihydronaphthalen-1(2*H*)-one,



G. (1*R*,4*R*)-4-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine (sertraline enantiomer).

01/2010:0433  
corrected 6.7



## SESAME OIL, REFINED

### Sesami oleum raffinatum

#### DEFINITION

Fatty oil obtained from the ripe seeds of *Sesamum indicum* L. by expression or extraction. It is then refined. Improved colour and odour may be obtained by further refining. It may contain a suitable antioxidant.

#### CHARACTERS

**Appearance:** clear, light yellow liquid, almost colourless.

**Solubility:** practically insoluble in ethanol (96 per cent), miscible with light petroleum.

**Relative density:** about 0.919.

**Refractive index:** about 1.473.

It solidifies to a butter-like mass at about – 4 °C.

#### IDENTIFICATION

**First identification:** A.

**Second identification:** B.

A. Composition of triglycerides (see Tests).

B. Identification of fatty oils by thin-layer chromatography (2.3.2).

**Results:** the chromatogram obtained is similar to the corresponding chromatogram shown in Figure 2.3.2-1.

#### TESTS

**Acid value (2.5.1):** maximum 0.5, determined on 10.0 g; maximum 0.3 if intended for use in the manufacture of parenteral preparations.

**Peroxide value (2.5.5):** maximum 10.0; maximum 5.0 if intended for use in the manufacture of parenteral preparations.

**Unsaponifiable matter (2.5.7):** maximum 2.0 per cent, determined on 5.0 g.

**Alkaline impurities (2.4.19).** It complies with the test for alkaline impurities in fatty oils.

**Cottonseed oil.** Mix 5 mL in a test-tube with 5 mL of a mixture of equal volumes of *pentanol R* and a 10 g/L solution of *sulfur R* in *carbon disulfide R*. Warm the mixture carefully until the carbon disulfide is expelled, and immerse the tube to 1/3 of its depth in boiling *saturated sodium chloride solution R*. No reddish colour develops within 15 min.

**Composition of triglycerides.** Liquid chromatography (2.2.29).

**Test solution.** Dilute 50.0 mg of the substance to be examined to 10.0 mL with a mixture of equal volumes of *acetone R* and *methylene chloride R*.

**Reference solutions.** Dissolve 80.0 mg of *triolein R* in a mixture of equal volumes of *acetone R* and *methylene chloride R* and dilute to 50.0 mL with the same mixture of solvents. Prepare

5 reference solutions by dilution of this solution so as to cover concentrations ranging from the disregard limit (0.5 per cent) to the upper limit for OLL (30.0 per cent).

Plot the logarithm of the area of the peak due to triolein against the logarithm of the concentration of triolein in the reference solution.

**Column:** 2 columns coupled in series:

- size of each column:  $l = 0.25$  m,  $\varnothing = 4$  mm;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography *R* (4  $\mu$ m).

**Mobile phase:**

- mobile phase A: *acetone R*, *methylene chloride R*, *acetonitrile R* (5:15:80 V/V/V);
- mobile phase B: *acetone R*, *acetonitrile R*, *methylene chloride R* (20:20:60 V/V/V);

| Time (min) | Mobile phase A (per cent V/V) | Mobile phase B (per cent V/V) |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 - 15     | 100 → 75                      | 0 → 25                        |
| 15 - 25    | 75                            | 25                            |
| 25 - 70    | 75 → 0                        | 25 → 100                      |
| 70 - 75    | 0 → 100                       | 100 → 0                       |
| 75 - 80    | 100                           | 0                             |

Flow rate: 1.0 mL/min.

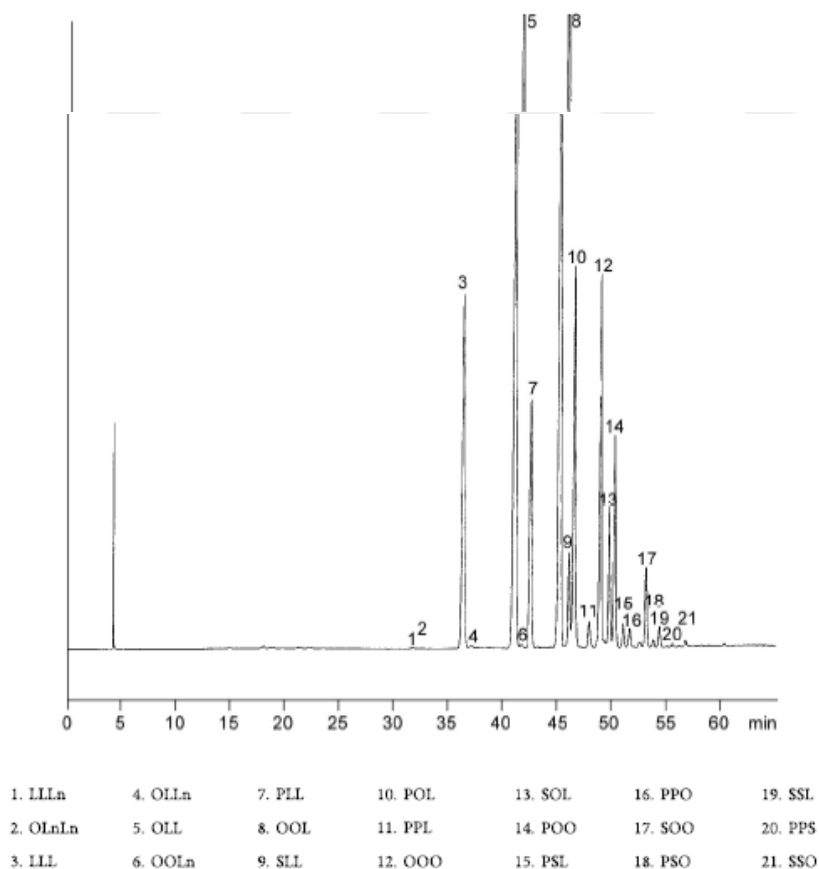


Figure 0433.-1. – Chromatogram for the composition of triglycerides in refined sesame oil

**Detection:** evaporative light-scattering detector; the following settings have been found to be suitable; if the detector has different setting parameters, adjust the detector settings so as to comply with the system suitability criterion:

- carrier gas: nitrogen R;
- flow rate: 0.7 L/min;
- evaporator temperature: 85 °C;
- nebuliser temperature: 45 °C.

**Injection:** 20 µL.

**Identification of peaks:** use the chromatograms obtained with the reference solutions to identify the peak due to triolein; identify the other peaks using the chromatogram shown in Figure 0433.-1. The fatty acids are designated as linolenic (Ln), linoleic (L), oleic (O), palmitic (P) and stearic (S).

**System suitability:** test solution:

- resolution: minimum 1.5 between the peaks due to OOO (triolein) and SOL.

Using the calibration curve obtained with the reference solutions, determine the percentage content of each peak with an area greater than that of the peak corresponding to the disregard limit (0.5 per cent). Assuming that the sum of these percentage contents is 100 per cent, normalise the percentage content of each of the 8 triglycerides specified below.

**Composition of triglycerides:**

- LLL: 7.0 per cent to 19.0 per cent;
- OLL: 13.0 per cent to 30.0 per cent;
- PLL: 5.0 per cent to 9.0 per cent;
- OOL: 12.0 per cent to 23.0 per cent;
- POL: 6.0 per cent to 14.0 per cent;
- OOO: 5.0 per cent to 14.0 per cent;
- SOL: 2.0 per cent to 8.0 per cent;

- POO: 2.0 per cent to 10.0 per cent.

**Water** (2.5.32): maximum 0.1 per cent, determined on 1.00 g.

#### STORAGE

In an airtight, well-filled container, protected from light; if intended for use in the manufacture of parenteral preparations store under an inert gas in an airtight container.

When the container has been opened, its contents are to be used as soon as possible. Any part of the contents not used at once is protected by an atmosphere of an inert gas.

#### LABELLING

The label states:

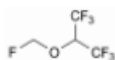
- whether the oil is obtained by expression or extraction;
- where applicable, that the substance is suitable for use in the manufacture of parenteral preparations;
- where applicable, the name of the inert gas used.



04/2016:2269

## SEVOFLURANE

### Sevofluranum



C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>F<sub>7</sub>O  
[28523-86-6]

*M*<sub>r</sub> 200.1

#### DEFINITION

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-(fluoromethoxy)propane.

#### CHARACTERS

**Appearance:** clear, colourless, volatile liquid.

**Solubility:** slightly soluble in water, miscible with ethanol (96 per cent).

**Relative density:** about 1.52.

**bp:** about 59 °C.

It is non-flammable.

It decomposes in the presence of Lewis acids; this decomposition is inhibited by water in sufficient quantity.

#### IDENTIFICATION

**Infrared absorption spectrophotometry** (2.2.24).

**Preparation:** examine the substance in the gaseous state or in the liquid state.

**Comparison:** sevoflurane CRS.

#### TESTS

**Acidity or alkalinity.** Introduce 20.0 mL of the substance to be examined and 20 mL of carbon dioxide-free water R into a separating funnel, shake for 3 min and allow to stand. Collect the aqueous upper layer and add 0.2 mL of bromocresol purple solution R. Not more than 0.10 mL of 0.01 M sodium hydroxide or 0.60 mL of 0.01 M hydrochloric acid is required to change the colour of the indicator.

**Refractive index** (2.2.6): 1.2745 to 1.2760.

**Related substances.** Gas chromatography (2.2.28).

**Internal standard:** methylal R.

**Test solution.** Introduce 20.0 mL of the substance to be examined into a vial and seal with a cap and septum. Using a microsyringe, add 5 µL of the internal standard and mix thoroughly.

**Reference solution (a).** Introduce 2.0 mL of ethylene chloride R

into a screw-cap vial and immediately seal with a cap and septum. Using a microsyringe, add about 20 µL of the substance to be examined. Record the quantity added, in milligrams, of the substance to be examined (*M*<sub>s</sub>). Then, using a microsyringe, add about 20 µL of the internal standard. Record the quantity added, in milligrams, of the internal standard (*M*<sub>i</sub>).

**Reference solution (b):** sevoflurane CRS (containing impurities A and B).

**Reference solution (c).** Introduce 20.0 mL of ethylene chloride R into a vial and seal with a cap and septum. Using a microsyringe, add 20 µL of the substance to be examined and mix thoroughly. Dilute 0.5 mL of this solution to 100.0 mL with ethylene chloride R.

**Column:**

- material: fused silica;
- size: *l* = 30 m, Ø = 0.32 mm;
- stationary phase: poly[(cyanopropyl)(phenyl)][dimethylsiloxane R (film thickness 3 µm).

**Carrier gas:** helium for chromatography R.

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Split ratio:** 1:20.

**Temperature:**

|                | Time<br>(min) | Temperature<br>(°C) |
|----------------|---------------|---------------------|
| Column         | 0 - 10        | 40                  |
|                | 10 - 26       | 40 → 200            |
|                | 26 - 40       | 200                 |
| Injection port |               | 200                 |
| Detector       |               | 225                 |

**Detection:** flame ionisation.

**Injection:** 2 µL.

## EK 2.

**Tablo E1.** *Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (1:9; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyel sonuçları*

| Yağ:sürfaktan<br>(1:9) | 1. gün               | Santrifüj | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDİ                | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |                   |                    |
|------------------------|----------------------|-----------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|
|                        |                      |           |                       |                         |                    |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDİ               | Zeta<br>potansiyel |
| K1-1                   | Akışkan, şeffaf      | -         | -                     | -                       | -                  | -                  | -                             | -                 | -                  |
| K1-2                   | Yoğun, bulanık       | x         | 0,057                 | 11,45±0,54              | 0,308±0,006        | -5,44±0,17         | -                             | -                 | -                  |
| K1-3                   | Yoğun, bulanık       | x         | 0,056                 | 95,30±31,57             | 0,212±0,028        | -5,60±0,495        | -                             | -                 | -                  |
| <b>K1-4</b>            | <b>Yoğun, şeffaf</b> | <b>x</b>  | <b>0,057</b>          | <b>11,32±1,64</b>       | <b>0,321±0,021</b> | <b>-6,20±0,346</b> | <b>11,93±0,76</b>             | <b>0,322±0,02</b> | <b>-3,26±0,06</b>  |
| K1-5                   | Yoğun, şeffaf        | x         | 0,056                 | 32,18±8,768             | 0,391±0,026        | -                  | -                             | -                 | -                  |
| K1-6                   | Yoğun, şeffaf        | x         | 0,057                 | 526,5±72,05             | 0,588±0,068        | -                  | -                             | -                 | -                  |
| K1-7                   | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,058                 | 79,25±57,31             | 0,471±0,059        | -                  | -                             | -                 | -                  |
| K1-8                   | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,057                 | 149,5±156,3             | 0,566±0,175        | -                  | -                             | -                 | -                  |
| K1-9                   | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,059                 | 387,9±69,95             | 0,512±0,017        | -                  | -                             | -                 | -                  |
| K1-10                  | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,058                 | 688,9±122,5             | 0,884±0,201        | -                  | -                             | -                 | -                  |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E2.** *Kişniş uçucu yağı: Tween 20 (2:8; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyel sonuçları*

| Yağ:sürfaktan<br>(2:8) | 1.gün                  | Santrifüj  | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu<br>(nm) | PDİ                | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |                    |                    |
|------------------------|------------------------|------------|-----------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
|                        |                        |            |                       |                            |                    |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDİ                | Zeta<br>potansiyel |
| K2-1                   | Akışkan, şeffaf        | -          | -                     | -                          | -                  | -                  | -                             | -                  | -                  |
| K2-2                   | Yoğun, bulanık         | Faz ayrımı | -                     | -                          | -                  | -                  | -                             | -                  | -                  |
| K2-3                   | Akışkan, şeffaf        | x          | 0,058                 | 31,67±9,27                 | 0,147±0,067        | -14,6±0,212        | 16,70±0,2                     | 0,505±0,01         | -                  |
| <b>K2-4</b>            | <b>Akışkan, şeffaf</b> | <b>x</b>   | <b>0,056</b>          | <b>10,74±0,23</b>          | <b>0,216±0,016</b> | <b>-11,5±2,79</b>  | <b>11,97±0,82</b>             | <b>0,338±0,045</b> | <b>-4,64±0,04</b>  |
| <b>K2-5</b>            | <b>Akışkan, şeffaf</b> | <b>x</b>   | <b>0,056</b>          | <b>11,86±0,47</b>          | <b>0,259±0,017</b> | <b>-9,875±1,45</b> | <b>11,18±0,5685</b>           | <b>0,196±0,03</b>  | <b>-7,03±0,552</b> |
| K2-6                   | Akışkan, şeffaf        | x          | 0,057                 | 14,69±1,69                 | 0,309±0,024        | -                  | 18,13±6,187                   | 0,376±0,079        | -                  |
| K2-7                   | Akışkan, şeffaf        | x          | 0,057                 | 62,41±29,86                | 0,457±0,111        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| K2-8                   | Akışkan, şeffaf        | x          | 0,059                 | 154,9±65,31                | 0,716±0,023        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| K2-9                   | Akışkan, şeffaf        | x          | 0,057                 | 240,1±34,32                | 0,490±0,146        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| K2-10                  | Akışkan, şeffaf        | x          | 0,057                 | 816,3±46,36                | 0,734±0,077        | -                  | -                             | -                  | -                  |

-: Ölçüm yapılmadı

X: Değişiklik yok

**Tablo E3.** *Kişniş uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık sonuçları*

| Yağ:sürfaktan<br>(3:7) | 1. gün           | Santrifüj                 | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu | PDİ         | Zeta potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |             |                    |
|------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|-------------|-----------------|-------------------------------|-------------|--------------------|
|                        |                  |                           |                       |                    |             |                 | Damlacık<br>boyutu            | PDİ         | Zeta<br>potansiyel |
| K3-1                   | Akışkan, şeffaf  | -                         | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-2                   | Akışkan, bulanık | Faz ayrımı                | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-3                   | Akışkan, şeffaf  | x                         | -                     | 17,45±0,055        | 0,467±0,007 | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-4                   | Akışkan, şeffaf  | x                         | -                     | 14,44±0,1833       | 0,316±0,029 | -4,59±0,990     | 120,5±1,115                   | 0,367±0,155 | -                  |
| K3-5                   | Akışkan, şeffaf  | x                         | -                     | 11,65±0,5011       | 0,165±0,064 | -9,63±0,516     | 70,47±1,863                   | 0,678±0,043 |                    |
| K3-6                   | Akışkan, bulanık | Faz ayrımı                | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-7                   | Akışkan, süt     | Faz ayrımı                | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-8                   | Akışkan, süt     | Faz ayrımı                | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-9                   | Akışkan, süt     | Faz ayrımı                | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |
| K3-10                  | Akışkan, süt     | Faz ayrımı,<br>kremalaşma | -                     | -                  | -           | -               | -                             | -           | -                  |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E4.** Biberiye uçucu yağı: Tween 20 (1:9; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyel sonuçları

| Yağ:<br>Sürfaktan<br>(1:9) | 1. gün               | Santrifüj | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDİ                | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |                    |                    |
|----------------------------|----------------------|-----------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
|                            |                      |           |                       |                         |                    |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDİ                | Zeta<br>potansiyel |
| R1-1                       | Akışkan, şeffaf      | -         | -                     | -                       | -                  | -                  | -                             | -                  | -                  |
| R1-2                       | Yoğun, yarı şeffaf   | x         | 0,057                 | 10,36±0,046             | 0,291±0,005        | -12,85±0,495       | -                             | -                  | -                  |
| <b>R1-3</b>                | <b>Yoğun, şeffaf</b> | <b>x</b>  | <b>0,057</b>          | <b>28,39±13,30</b>      | <b>0,339±0,033</b> | <b>-9,61±0,686</b> | <b>15,05±0,199</b>            | <b>0,340±0,036</b> | <b>-6,42±1,38</b>  |
| R1-4                       | Yoğun, şeffaf        | x         | 0,057                 | 50,17±18,06             | 0,541±0,043        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| R1-5                       | Yoğun, şeffaf        | x         | 0,056                 | 31,88±15,67             | 0,277±0,083        | -11,08±2,150       | 25,79±20,66                   | 0,409±0,085        |                    |
| R1-6                       | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,057                 | 294,5±160,5             | 0,598±0,164        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| R1-7                       | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,057                 | 515,7±93,26             | 0,564±0,031        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| R1-8                       | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,058                 | 113,0±58,55             | 0,373±0,024        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| R1-9                       | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,059                 | 484,9±173,4             | 0,676±0,117        | -                  | -                             | -                  | -                  |
| R1-10                      | Akışkan, şeffaf      | x         | 0,057                 | 722,6±342,2             | 0,832±0,150        | -                  | -                             | -                  | -                  |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E5.** Biberiye uçucu yağı: Tween 20 (2:8; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel sonuçları

| Yağ:sürfaktan<br>(2:8) | 1. gün                       | Santrifüj | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDI                | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |                    |                   |
|------------------------|------------------------------|-----------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|
|                        |                              |           |                       |                         |                    |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDI                | Zeta potansiyel   |
| R2-1                   | Akışkan, şeffaf,<br>çözünmüş | -         | -                     | -                       | -                  | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-2                   | Yoğun, yarı şeffaf           | x         | 0,057                 | 17,14±0,82              | 0,356±0,019        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-3                   | Yoğun, bulanık               | x         | 0,059                 | 14,77±1,797             | 0,358±0,057        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-4                   | Yoğun, bulanık               | x         | 0,057                 | 25,77±8,214             | 0,432±0,032        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| <b>R2-5</b>            | <b>Yoğun, şeffaf</b>         | <b>x</b>  | <b>0,057</b>          | <b>32,17±18,76</b>      | <b>0,338±0,025</b> | <b>-8,48±0,919</b> | <b>30,98±9,69</b>             | <b>0.319±0.006</b> | <b>-1.18±0.63</b> |
| R2-6                   | Akışkan, şeffaf              | x         | 0,058                 | 198,2±125,3             | 0,596±0,356        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-7                   | Akışkan, şeffaf              | x         | 0,057                 | 73,20±61,76             | 0,363±0,048        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-8                   | Akışkan, şeffaf              | x         | 0,055                 | 63,24±13,89             | 0,529±0,044        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-9                   | Akışkan, şeffaf              | x         | 0,057                 | 657,3±112,3             | 0,611±0,048        | -                  | -                             | -                  | -                 |
| R2-10                  | Akışkan, şeffaf              | x         | 0,058                 | 458,1±49,85             | 0,725±0,139        | -                  | -                             | -                  | -                 |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E6.** Biberiye uçucu yağı:Tween 20 (3:7; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel sonuçları

| Yağ:sürfaktan<br>(3:7) | 1. gün                    | Santrifüj  | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDI         |
|------------------------|---------------------------|------------|-----------------------|-------------------------|-------------|
| R3-1                   | Akışkan, şeffaf, çözülmüş | -          | -                     | -                       | -           |
| R3-2                   | Akışkan, yarı şeffaf      | x          | 0,067                 | 472,0±127,2             | 0,555±0,091 |
| R3-3                   | Yoğun, şeffaf             | x          | 0,075                 | 14,32±0,38              | 0,384±0,019 |
| R3-4                   | Yoğun, bulanık            | Faz ayrımı | -                     | -                       | -           |
| R3-5                   | Yoğun, şeffaf             | x          | 0,083                 | 85,02±70,06             | 0,586±0,22  |
| R3-6                   | Akışkan, bulanık          | Kremalaşma | -                     | -                       | -           |
| R3-7                   | Akışkan, yarı şeffaf      | Kremalaşma | -                     | -                       | -           |
| R3-8                   | Akışkan, yarı şeffaf      | Kremalaşma | -                     | -                       | -           |
| R3-9                   | Akışkan, yarı şeffaf      | Kremalaşma | -                     | -                       | -           |
| R3-10                  | Akışkan, şeffaf           | Kremalaşma | -                     | -                       | -           |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E7.** Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı içeren emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyel sonuçları [Yağ:Tween 20 (1:9; a:a)]

| Yağ:sürfaktan<br>(1:9) | 1. gün             | Santrifüj  | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDİ         | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |             |                    |
|------------------------|--------------------|------------|-----------------------|-------------------------|-------------|--------------------|-------------------------------|-------------|--------------------|
|                        |                    |            |                       |                         |             |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDİ         | Zeta<br>potansiyel |
| RK1-1                  | Akışkan, şeffaf    | -          | -                     | -                       | -           | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK1-2                  | Yoğun, bulanık     | Faz ayrımı | -                     | -                       | -           | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK1-3                  | Yoğun, yarı şeffaf | x          | 0,059                 | 21,07±8,57              | 0,348±0,019 | -10,9±1,13         | 14,83±1,905                   | 0,477±0,064 | -                  |
| RK1-4                  | Yoğun, şeffaf      | x          | 0,057                 | 15,20±2,39              | 0,324±0,035 | -12,7±0,141        | 14,15±0,6846                  | 0,408±0,039 | -                  |
| RK1-5                  | Yoğun, şeffaf      | x          | 0,058                 | 17,76±5,36              | 0,278±0,064 | -10,3±0,559        | 362,1±24,80                   | 0,448±0,083 | -                  |
| RK1-6                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,057                 | 122,2±58,08             | 0,433±0,070 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK1-7                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,059                 | 367,6±126,7             | 0,475±0,048 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK1-8                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,057                 | 202,0±131,8             | 0,451±0,102 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK1-9                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,057                 | 271,2±96,09             | 0,561±0,154 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK1-10                 | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,057                 | 1267±160,61             | 0,744±0,056 | -                  | -                             | -           | -                  |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E8.** Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı içeren emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel sonuçları [Yağ:Tween 20 (2:8)]

| Yağ:sürfaktan<br>(2:8) | 1. gün             | Santrifüj  | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDI         | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |             |                    |
|------------------------|--------------------|------------|-----------------------|-------------------------|-------------|--------------------|-------------------------------|-------------|--------------------|
|                        |                    |            |                       |                         |             |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDI         | Zeta<br>potansiyel |
| RK2-1                  | Akışkan, şeffaf    | -          | -                     | -                       | -           | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-2                  | Yoğun, bulanık     | Faz ayrımı | -                     | -                       | -           | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-3                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,061                 | 10,48±0,157             | 0,247±0,009 | -5,20±1,95         | 18,92±2,012                   | 0,510±0,029 | -                  |
| RK2-4                  | Yoğun, yarı şeffaf | x          | 0,058                 | 19,48±6,195             | 0,443±0,045 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-5                  | Yoğun, bulank      | x          | 0,063                 | 47,31±1,044             | 0,536±0,010 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-6                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,063                 | 178,0±58,61             | 0,920±0,139 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-7                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,058                 | 197,7±166,0             | 0,769±0,211 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-8                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,059                 | 667,5±53,95             | 0,913±0,080 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-9                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,059                 | 1000±181,1              | 0,864±0,163 | -                  | -                             | -           | -                  |
| RK2-10                 | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,057                 | 1107±118,6              | 0,855±0,139 | -                  | -                             | -           | -                  |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E9.** Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı içeren emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel sonuçları [Yağ:Tween 20 (3:7, a:a)]

| Yağ:sürfaktan<br>(3:7) | 1. gün             | Santrifüj  | Absorbans<br>(600 nm) | Damlacık<br>boyutu (nm) | PDI         | Zeta<br>potansiyel | Stabilite çalışmaları sonrası |             |                    |
|------------------------|--------------------|------------|-----------------------|-------------------------|-------------|--------------------|-------------------------------|-------------|--------------------|
|                        |                    |            |                       |                         |             |                    | Damlacık<br>boyutu (nm)       | PDI         | Zeta<br>potansiyel |
| RK3-1                  | Akışkan, şeffaf    | -          | -                     | -                       | -           | -                  |                               |             |                    |
| RK3-2                  | Yoğun, bulanık     | Faz ayrımı | -                     | -                       | -           | -                  |                               |             |                    |
| RK3-3                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,074                 | 12,87±0,395             | 0,235±0,046 | -2,815±0,474       | 26,87±0,451                   | 0,580±0,062 |                    |
| RK3-4                  | Yoğun, yarı şeffaf | x          | 0,083                 | 14,6±1,73               | 0,352±0,014 | -9,90±1,56         | 28,89±2,529                   | 0,689±0,02  |                    |
| RK3-5                  | Yoğun, bulanık     | x          | 0,066                 | 384,2±62,91             | 0,419±0,014 | -                  |                               |             |                    |
| RK3-6                  | Akışkan, şeffaf    | x          | 0,069                 | 70,86±14,77             | 0,771±0,055 | -                  |                               |             |                    |
| RK3-7                  | Akışkan, bulanık   | Faz ayrımı | -                     | -                       | -           | -                  |                               |             |                    |
| RK3-8                  | Akışkan, süt       | Kremalaşma | -                     | -                       | -           | -                  |                               |             |                    |
| RK3-9                  | Akışkan, süt       | Kremalaşma | -                     | -                       | -           | -                  |                               |             |                    |
| RK3-10                 | Akışkan, süt       | Kremalaşma | -                     | -                       | -           | -                  |                               |             |                    |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok

**Tablo E10.** Oleik asit:Tween 20 (1:9; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ değerleri

| Yağ:süpfaktan (1:9) | 1. gün          | Santrifüj  | Absorbans (600 nm) | Damlacık boyutu (nm) | PDİ         |
|---------------------|-----------------|------------|--------------------|----------------------|-------------|
| O1-1                | Yoğun, şeffaf   | -          | -                  | -                    | -           |
| O1-2                | Yoğun, bulanık  | Faz ayrımı | -                  | -                    | -           |
| O1-3                | Yoğun, bulanık  | Faz ayrımı | -                  | -                    | -           |
| O1-4                | Yoğun, şeffaf   | x          | 0,065              | 25,65±0,73           | 0,452±0,064 |
| O1-5                | Yoğun, şeffaf   | x          | 0,060              | 23,99±0,17           | 0,495±0,013 |
| O1-6                | Yoğun, şeffaf   | x          | 0,060              | 23,89±0,47           | 0,423±0,067 |
| O1-7                | Akışkan, şeffaf | x          | 0,068              | 26,24±0,19           | 0,351±0,01  |
| O1-8                | Akışkan, şeffaf | x          | 0,059              | 27,37±0,34           | 0,434±0,054 |
| O1-9                | Akışkan, şeffaf | x          | 0,060              | 33,04±0,69           | 0,553±0,016 |
| O1-10               | Akışkan, şeffaf | x          | 0,063              | 48,22±11,44          | 0,608±0,168 |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok.

**Tablo E11.** Oleik asit:Tween 20 (2:8; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDİ değerleri

| Yağ:süpfaktan (2:8) | 1. gün                   | Santrifüj | Absorbans (600 nm) | Damlacık boyutu | PDİ         |
|---------------------|--------------------------|-----------|--------------------|-----------------|-------------|
| O2-1                | Yoğun, şeffaf            | -         | -                  | -               | -           |
| O2-2                | Yoğun, bulanık           | x         | 0,802              | 156,77±3        | 0,386±0,019 |
| O2-3                | Jel, bulanık             | -         | -                  | -               | -           |
| O2-4                | Jel, bulanık             | -         | -                  | -               | -           |
| O2-5                | Jel, süt                 | -         | -                  | -               | -           |
| O2-6                | Jel, süt                 | -         | -                  | -               | -           |
| O2-7                | Yoğun, süt, kremalaşma   | -         | -                  | -               | -           |
| O2-8                | Akışkan, süt, kremalaşma | -         | -                  | -               | -           |
| O2-9                | Akışkan, süt, kremalaşma | -         | -                  | -               | -           |
| O2-10               | Akışkan, süt, kremalaşma | -         | -                  | -               | -           |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok.

**Tablo E12.** Oleik asit:Tween 20 (3:7; a:a) emülsiyonlarının dış görünüşleri, bulanıklık, damlacık boyutu, PDI değerleri

| Yağ:sürfaktan (3:7) | 1. gün                   | Santrifüj | Absorbans (600 nm) | Damlacık boyutu (nm) | PDI         |
|---------------------|--------------------------|-----------|--------------------|----------------------|-------------|
| O3-1                | Yoğun, şeffaf            | -         | -                  | -                    | -           |
| O3-2                | Yoğun, bulanık           | x         | 2,000              | 194,07±3,25          | 0,438±0,029 |
| O3-3                | Yoğun, şeffaf            | x         | 1,593              | 219,97±7,48          | 0,534±0,114 |
| O3-4                | Yoğun, bulanık           | x         | 1,777              | 238,87±4,44          | 0,464±0,034 |
| O3-5                | Jel, yarı şeffaf         | -         | -                  | -                    | -           |
| O3-6                | Jel, yarı şeffaf         | -         | -                  | -                    | -           |
| O3-7                | Jel, bulanık             | -         | -                  | -                    | -           |
| O3-8                | Jel, bulanık             | -         | -                  | -                    | -           |
| O3-9                | Akışkan, süt, kremalaşma | -         | -                  | -                    | -           |
| O3-10               | Akışkan, süt, kremalaşma | -         | -                  | -                    | -           |

-: Ölçüm yapılmadı

x: Değişiklik yok.

**Tablo E13.** 1:9 (a:a) oranında Susam yağı:Tween 20/Span 80 (1/1) hazırlanan emülsiyonların görünüşleri, santrifüjleme stabiliteleri

| Yağ:sürfaktan (1:9) | 1. gün           | Santrifüj  |
|---------------------|------------------|------------|
| S1-1                | Akışkan, şeffaf, | -          |
| S1-2                | Yoğun, bulanık   | Faz ayrımı |
| S1-3                | Yoğun, bulanık   | Faz ayrımı |
| S1-4                | Jel, bulanık     | -          |
| S1-5                | Jel, süt         | -          |
| S1-6                | Jel, süt         | -          |
| S1-7                | Akışkan, süt     | -          |
| S1-8                | Akışkan, süt     | -          |
| S1-9                | Akışkan, süt     | -          |
| S1-10               | Akışkan, süt     | -          |

-: Ölçüm yapılmadı

**Tablo E14.** 2:8 (a:a) oranında Susam yağı:Tween 20/Span 80 (1/1) hazırlanan emülsiyonların görünüşleri, santrifüjleme stabiliteleri

| Yağ:sürfaktan (2:8) | 1. gün          | Santrifüj  |
|---------------------|-----------------|------------|
| S2-1                | Akışkan, şeffaf | -          |
| S2-2                | Yoğun, bulanık  | Faz ayrımı |
| S2-3                | Yoğun, bulanık  | Faz ayrımı |
| S2-4                | Jel, bulanık    | -          |
| S2-5                | Jel, süt        | -          |
| S2-6                | Yoğun, süt      | -          |
| S2-7                | Yoğun, süt      | -          |
| S2-8                | Akışkan, süt    | -          |
| S2-9                | Akışkan, süt    | -          |
| S2-10               | Akışkan, süt    | -          |

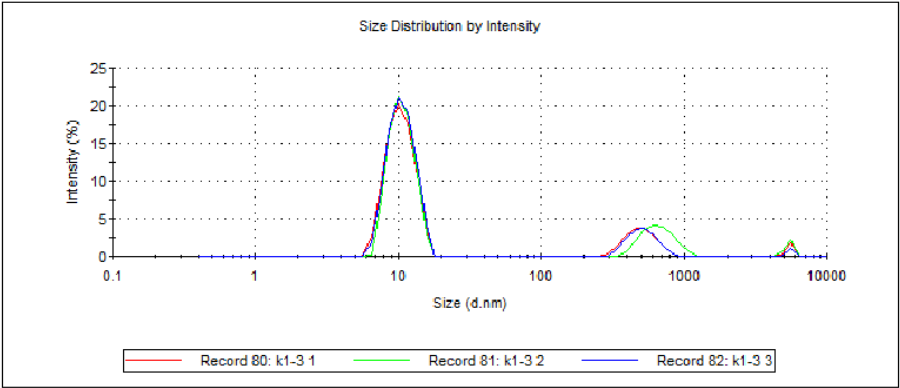
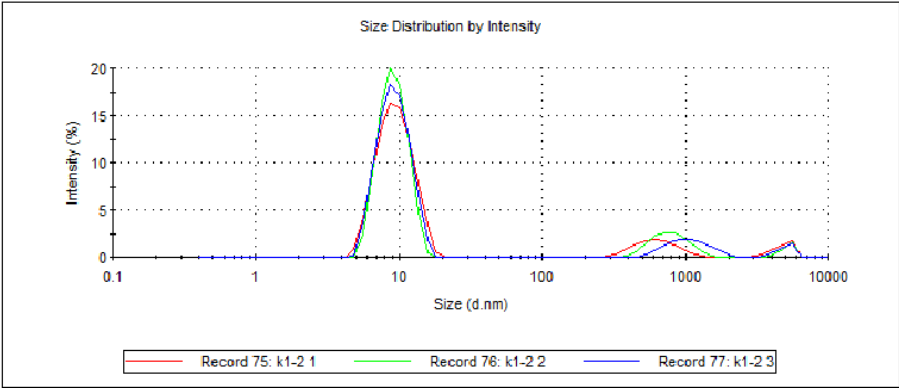
-: Ölçüm yapılmadı

**Tablo E15.** 3:7 (a:a) oranında Susam yağı:Tween 20/Span 80 (1/1) hazırlanan emülsiyonların görünüşleri, santrifüjleme stabiliteleri

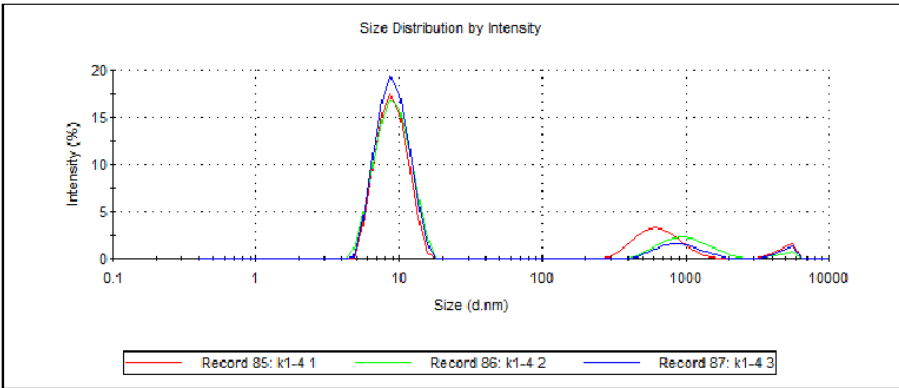
| Yağ:sürfaktan (3:7) | 1. gün         | Santrifüj  |
|---------------------|----------------|------------|
| S3-1                | Yoğun, şeffaf  | -          |
| S3-2                | Yoğun, bulanık | Faz ayrımı |
| S3-3                | Yoğun, bulanık | Faz ayrımı |
| S3-4                | Jel, bulanık   | -          |
| S3-5                | Jel, süt       | -          |
| S3-6                | Yoğun, süt     | -          |
| S3-7                | Yoğun, süt     | -          |
| S3-8                | Akışkan, süt   | -          |
| S3-9                | Akışkan, süt   | -          |
| S3-10               | Akışkan, süt   | -          |

-: Ölçüm yapılmadı

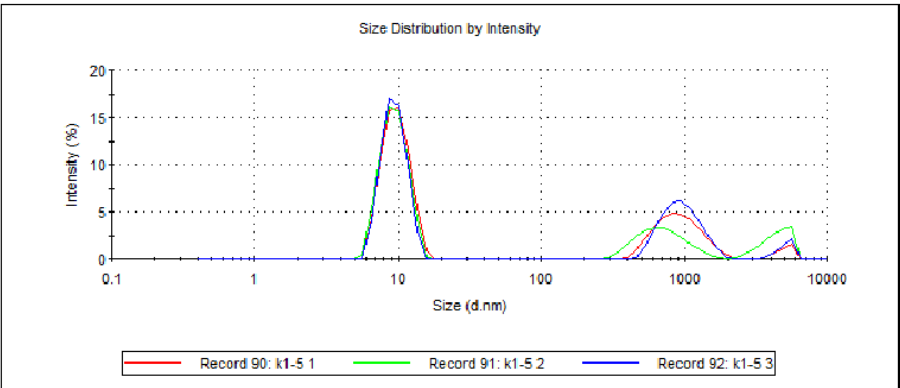
EK 3.



K1-2

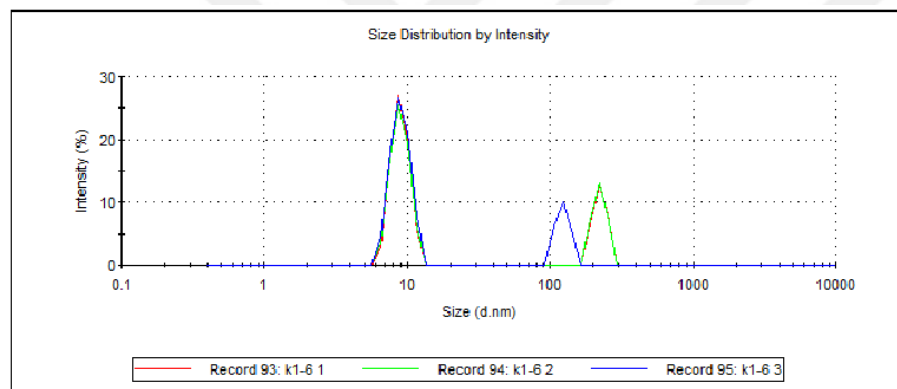


K1-3

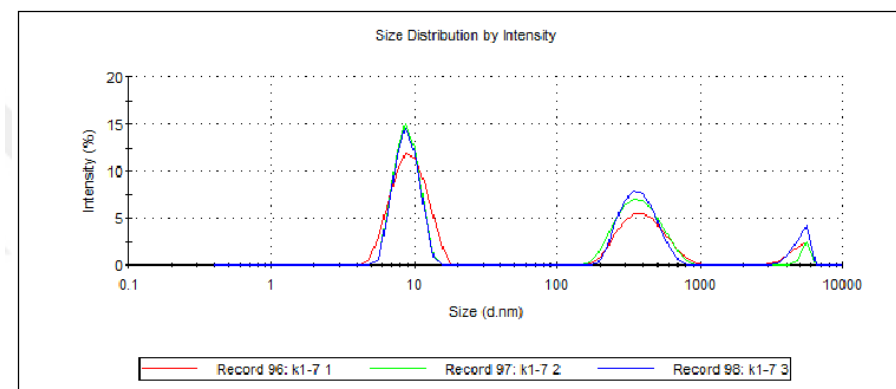


K1-4

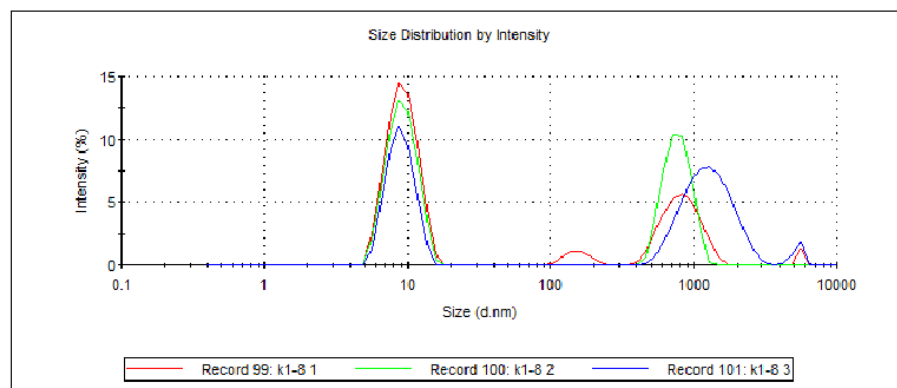
K1-5



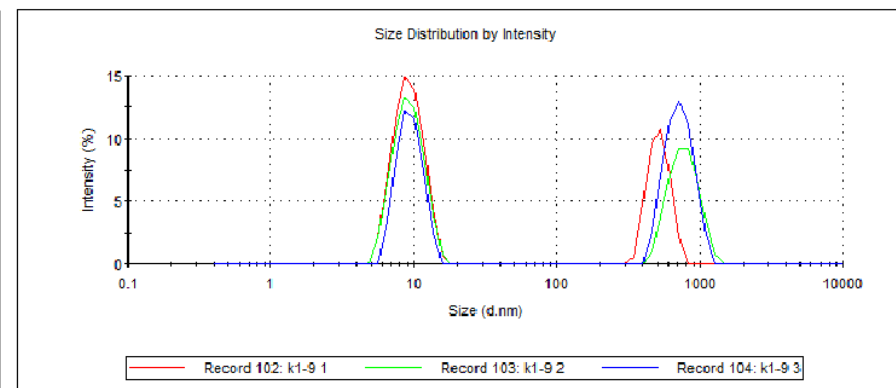
**K1-6**



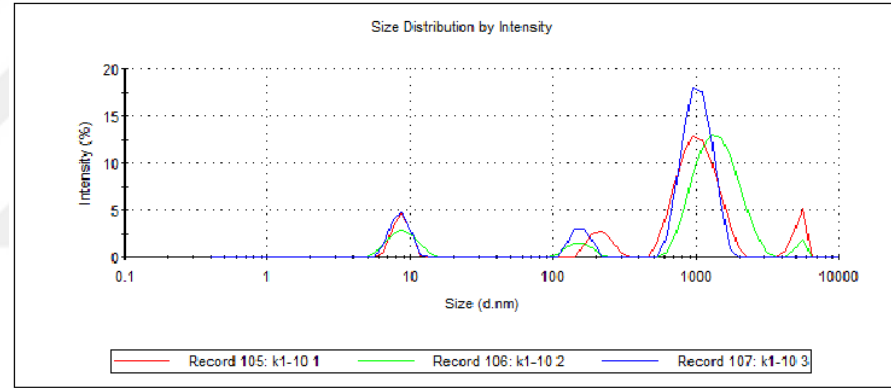
**K1-7**



**K1-8**

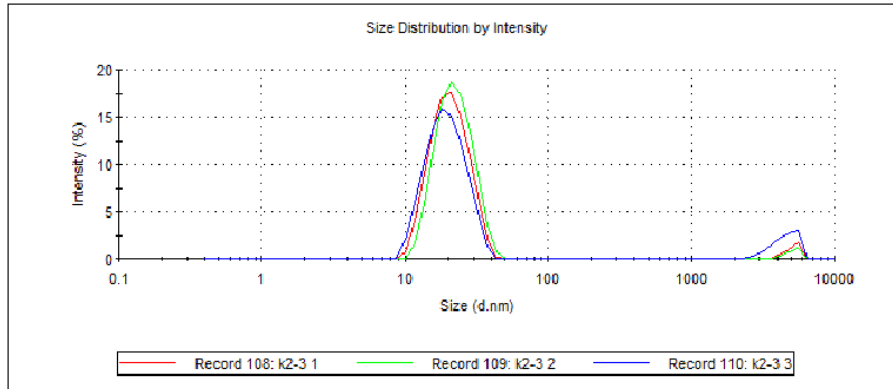


**K1-9**

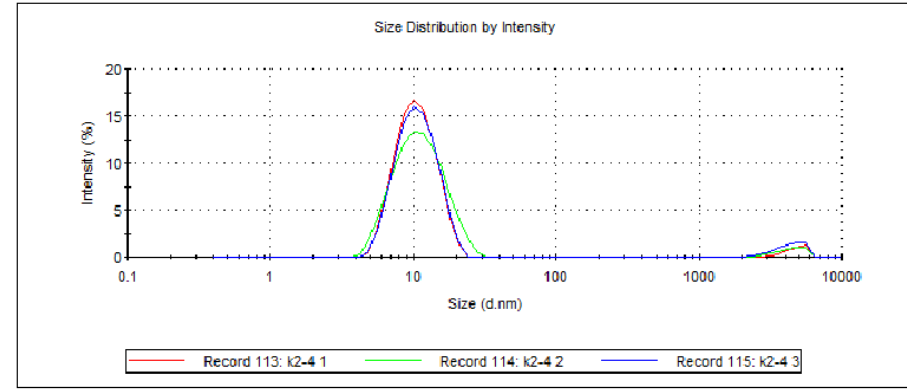


**K1-10**

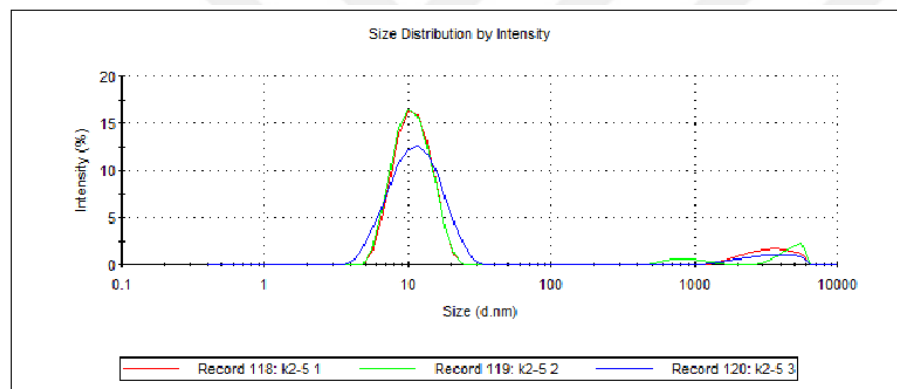
**Şekil E1.** (K1 serisi)1:9 oranında kişniş uçucu yağı:Tween 20 içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut analizlerinin spektrumları



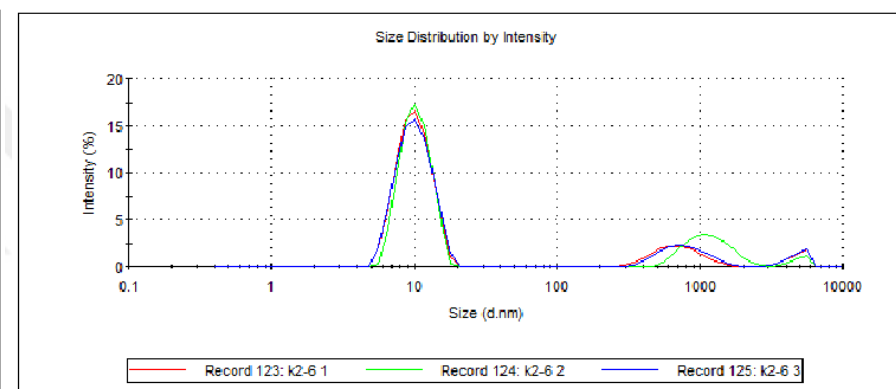
**K2-3**



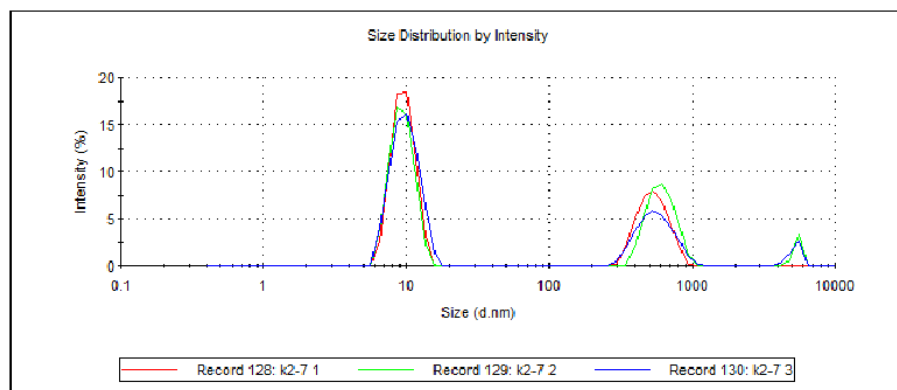
**K2-4**



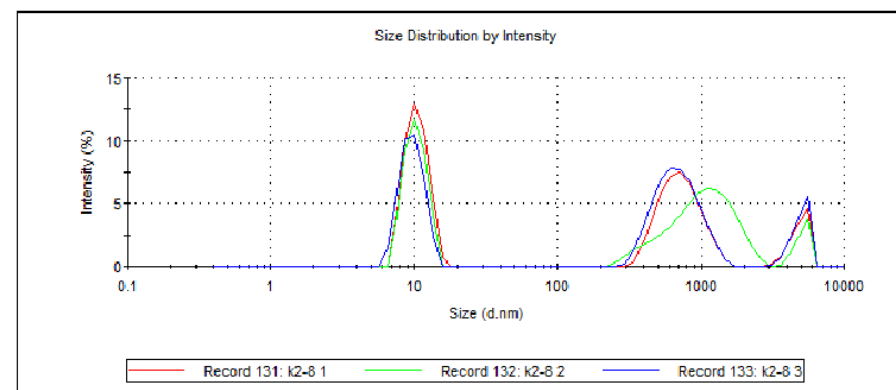
K2-5



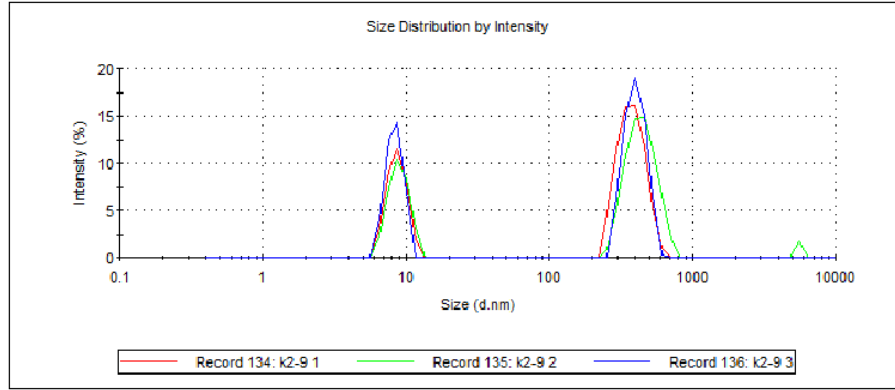
K2-6



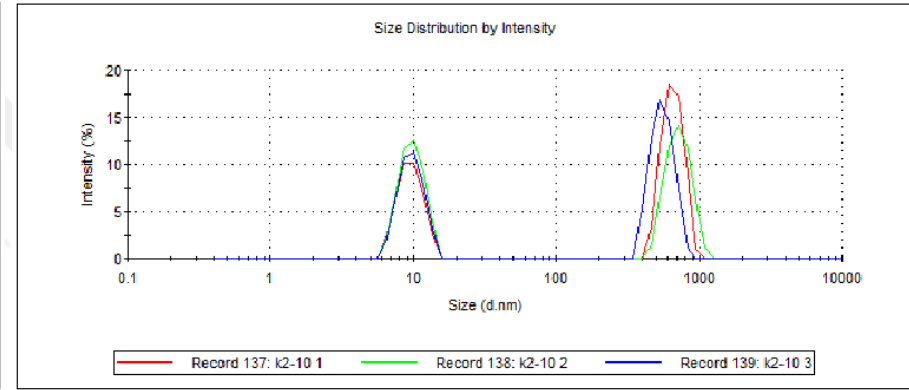
K2-7



K2-8

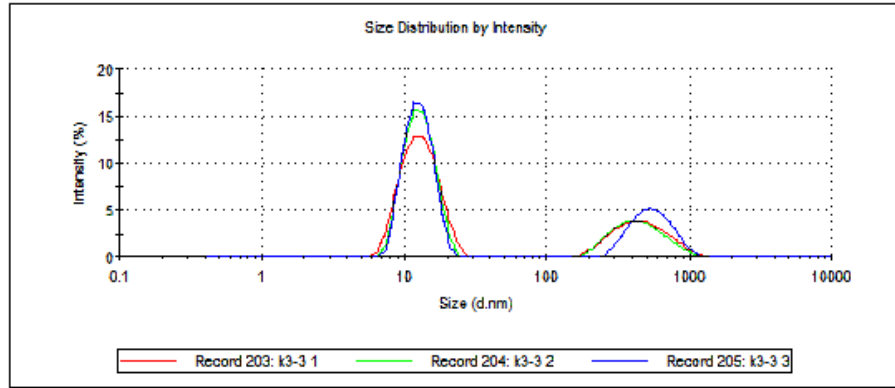


K2-9

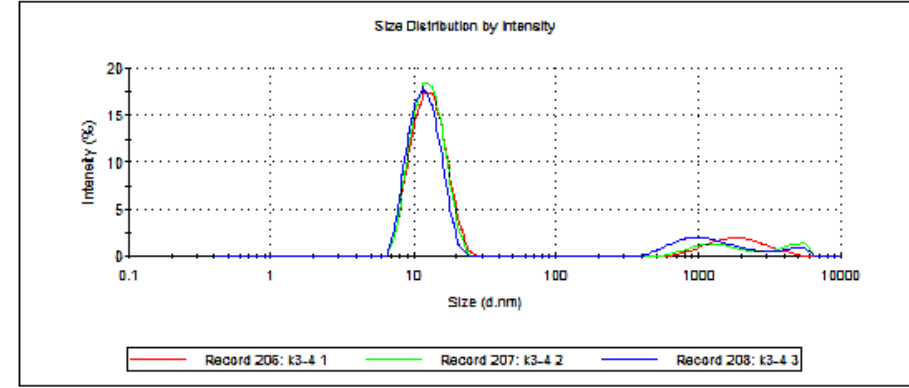


K2-10

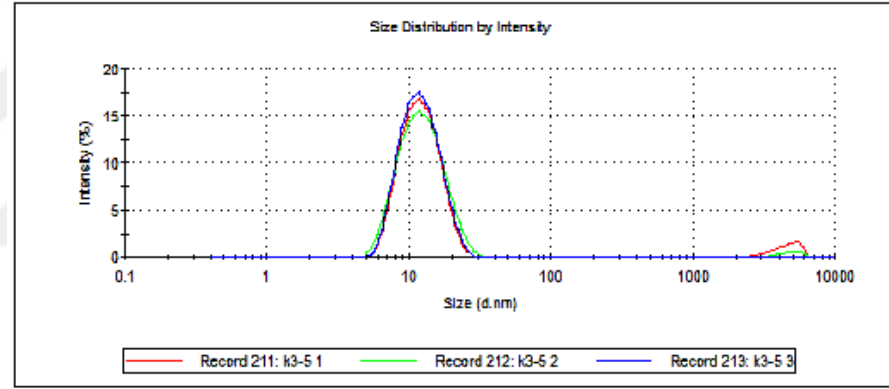
Şekil E2. (K2 serisi) 2:8 oranında kişniş uçucu yağı:Tween 20 içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut analizlerinin spektrumları



K3-3

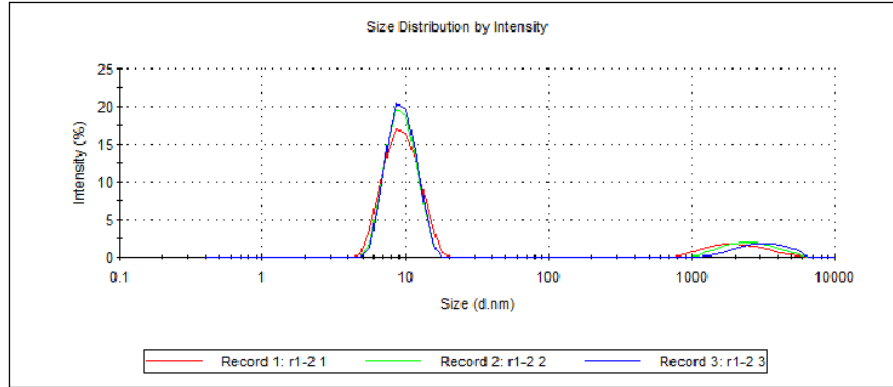


K3-4

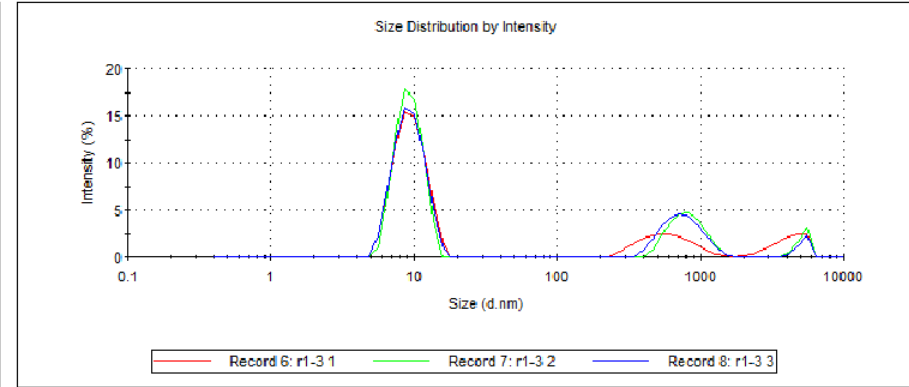


K3-5

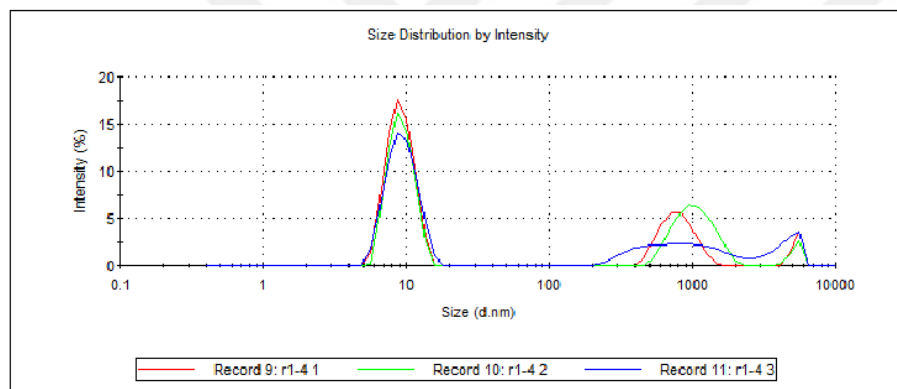
Şekil E3. (K3 serisi) 3:7 oranında kişniş uçucu yağı:Tween 20 içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut analizlerinin spektrumları



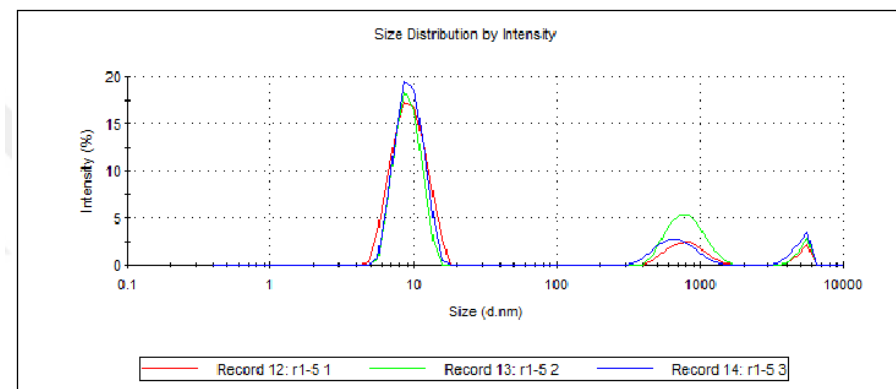
R1-2



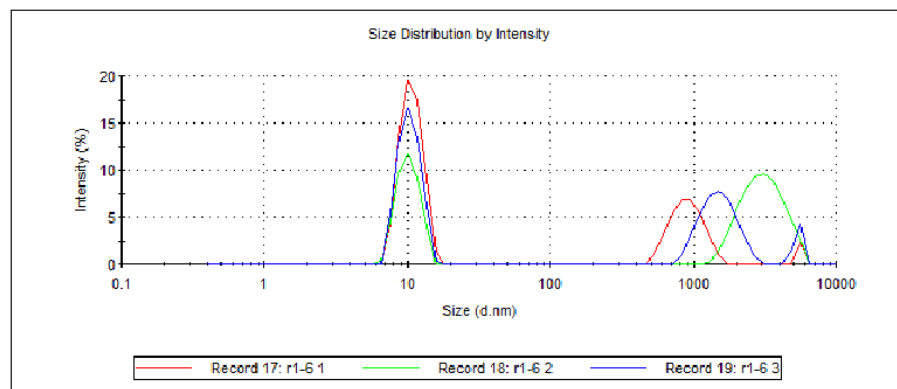
R1-3



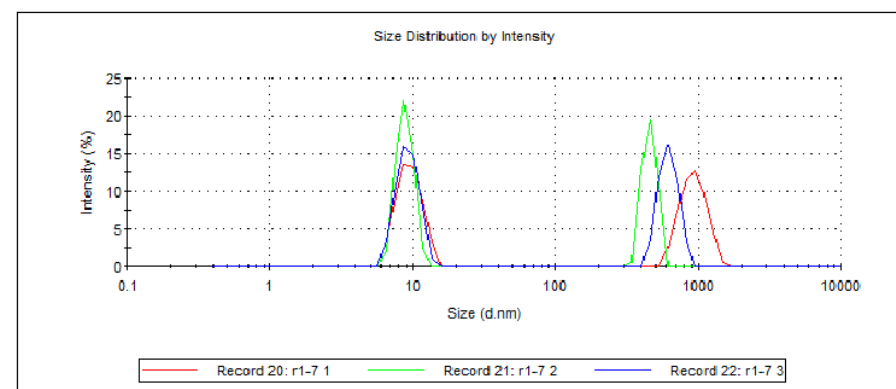
R1-4



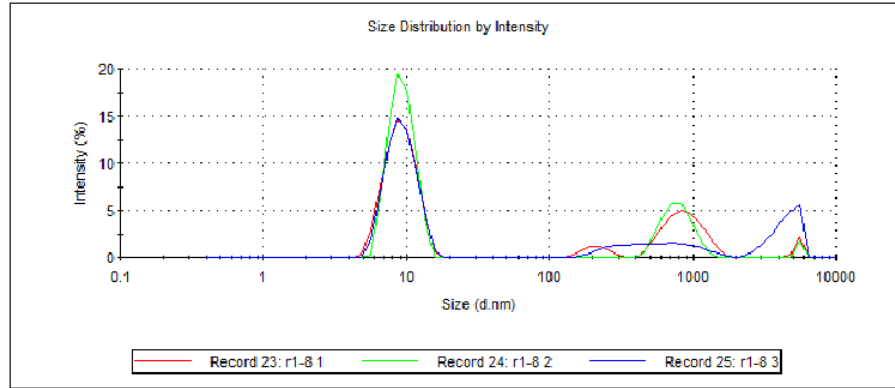
R1-5



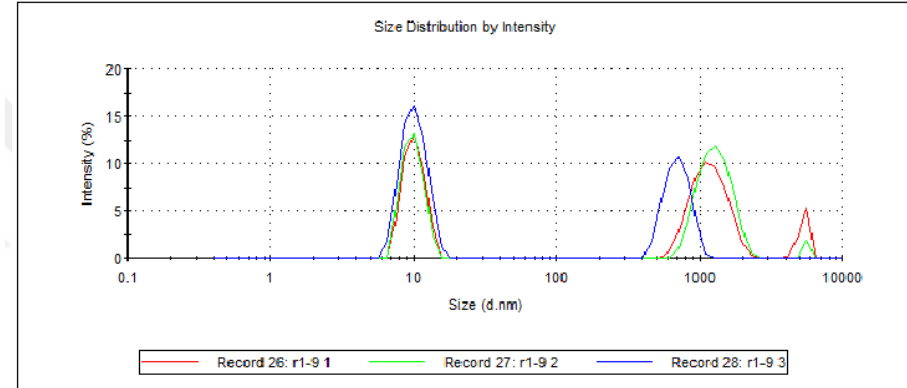
R1-6



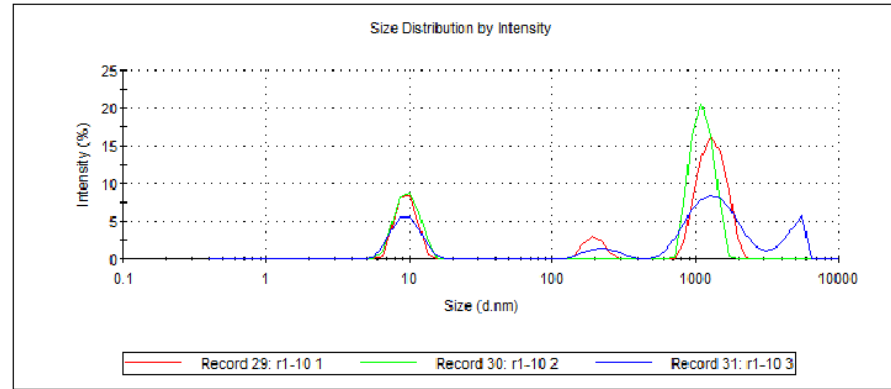
R1-7



**R1-8**

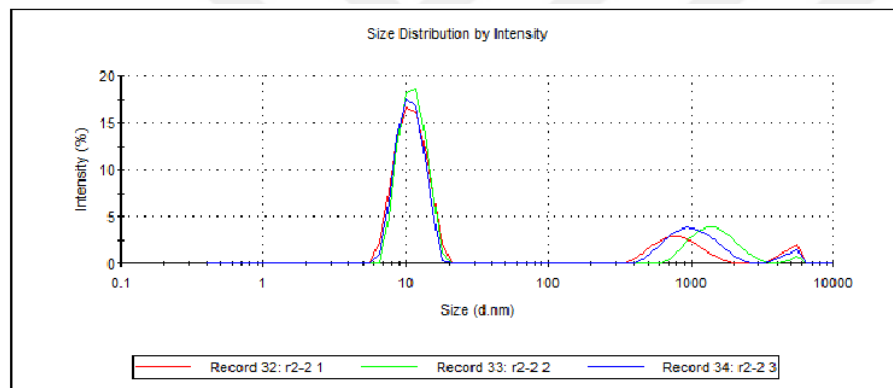


**R1-9**

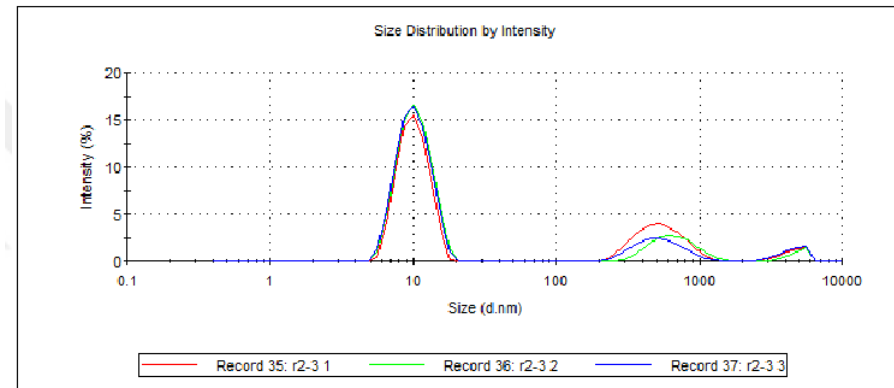


**R1-10**

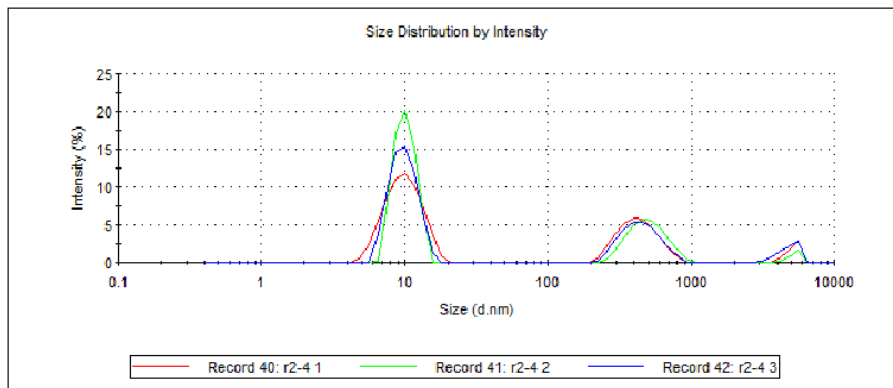
**Şekil E4.** (R1 serisi) 1:9 oranında biberiye uçucu yağı:Tween 20 içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut analizlerinin spektrumları



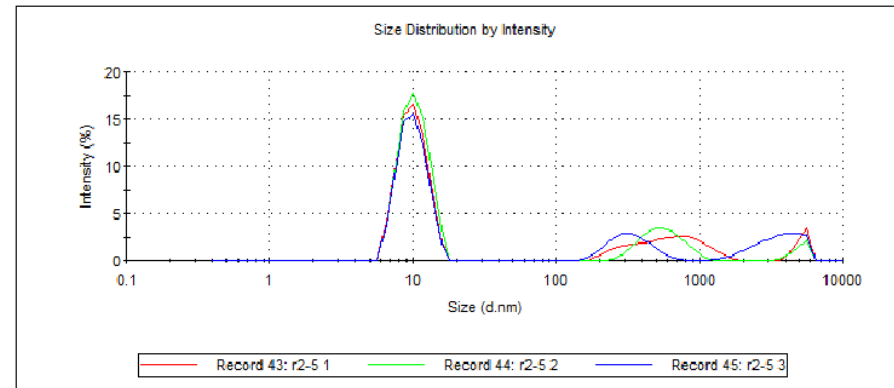
R2-2



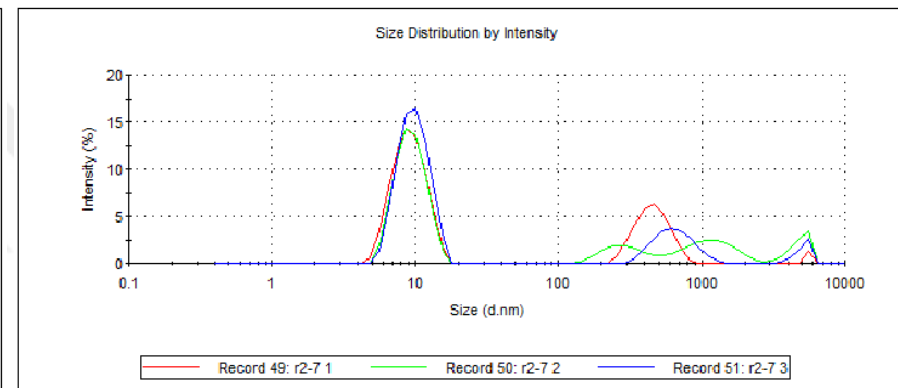
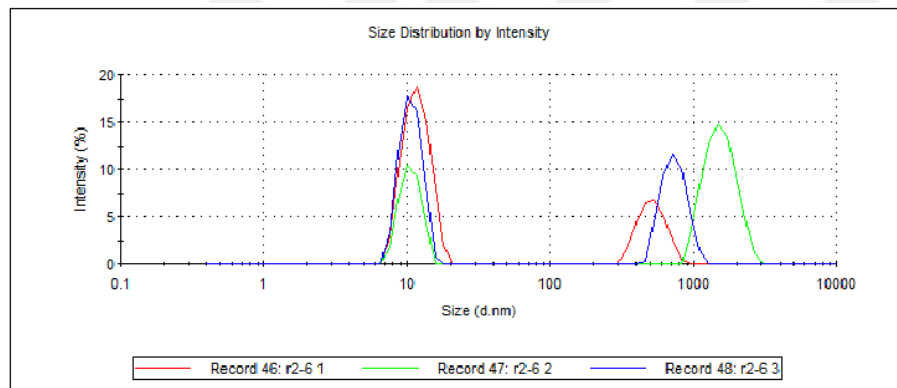
R2-3



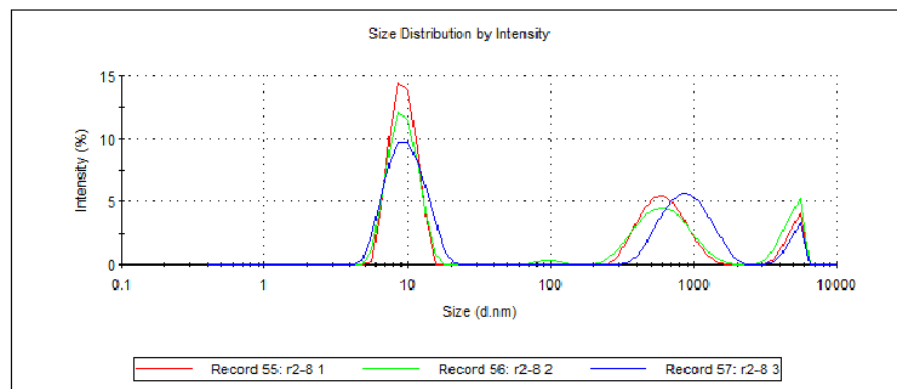
R2-4



R2-5

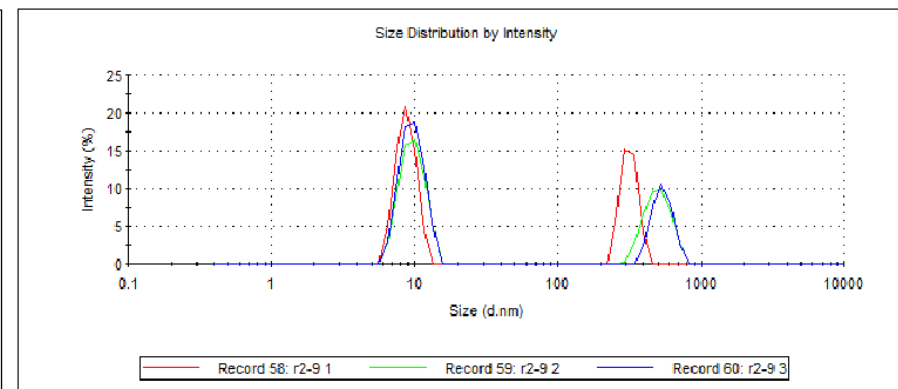


R2-6

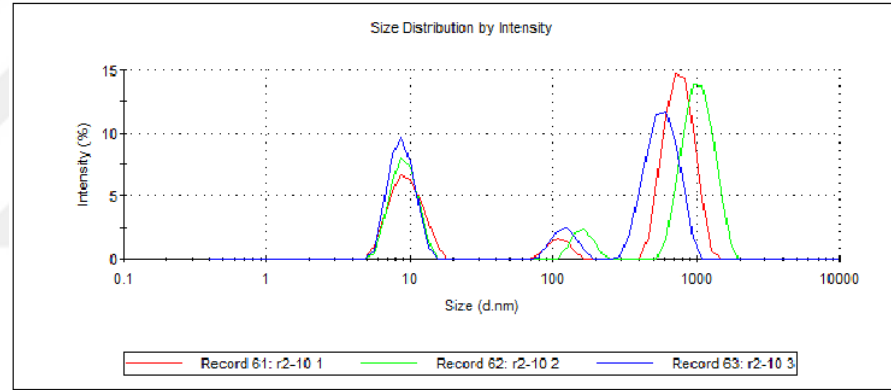


R2-8

R2-7

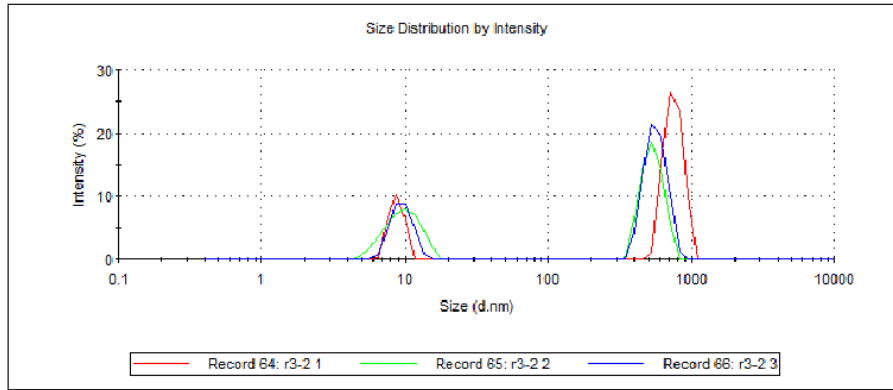


R2-9

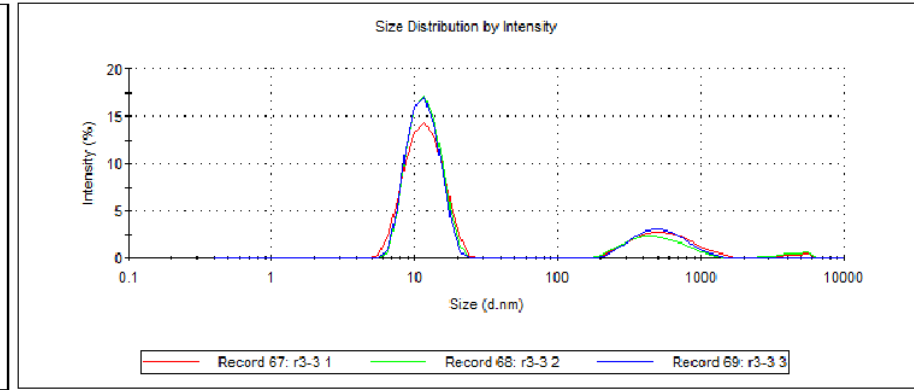


**R2-10**

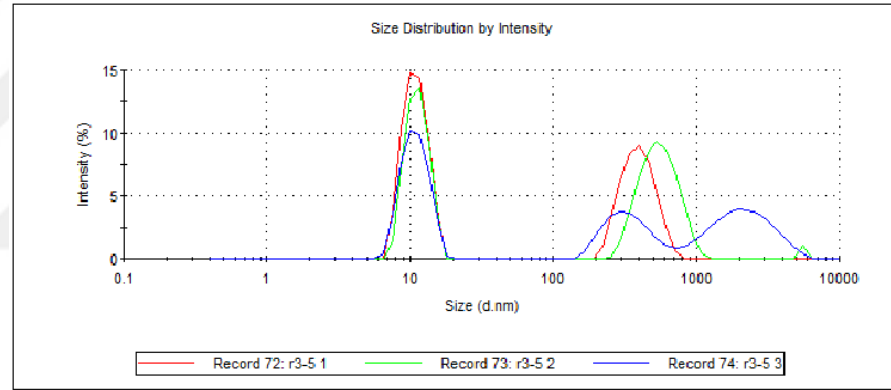
**Şekil E5.** (R2 serisi) 2:8 oranında biberiye uçucu yağı:Tween 20 içeren emülsiyonların zeta boyut analizlerinin spektrumları



**R3-2**

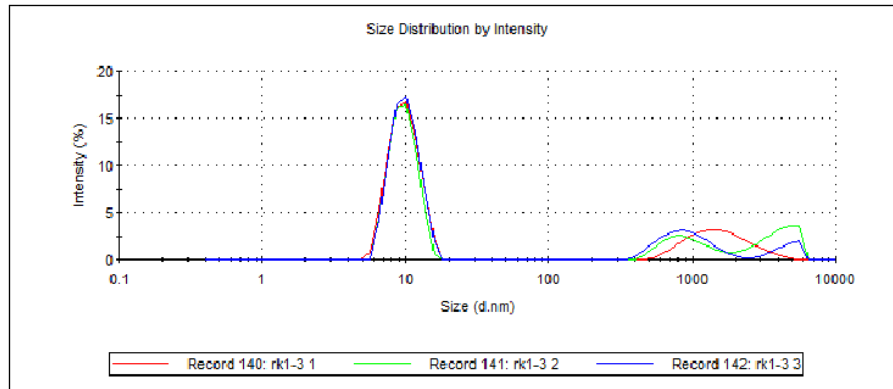


**R3-3**

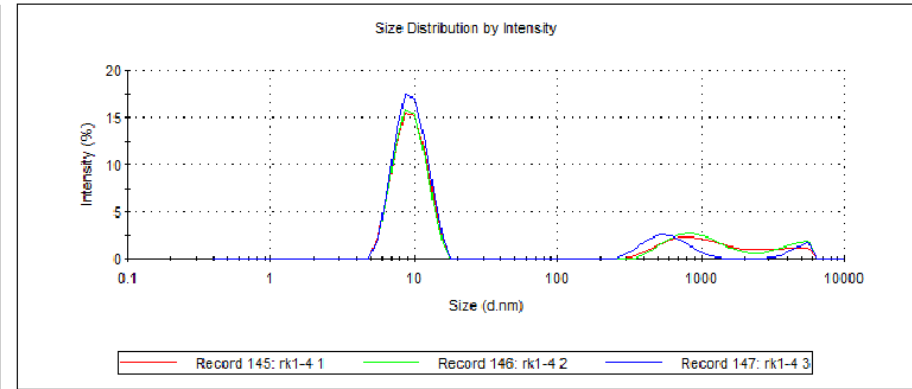


**R3-5**

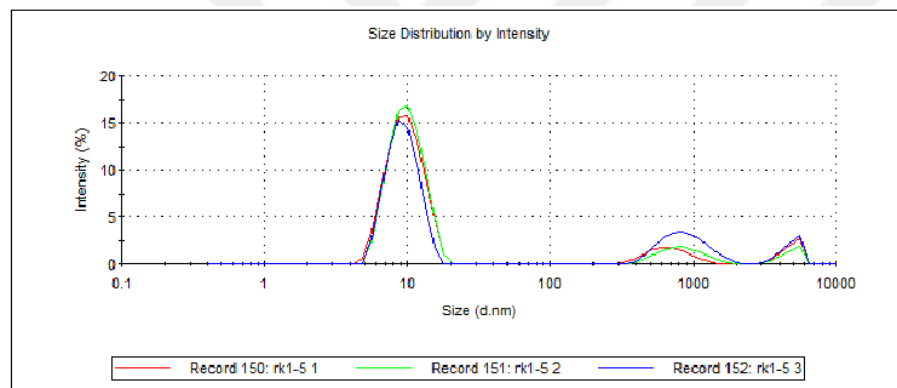
**Şekil E6.** (R3 serisi) 3:7 oranında biberiye uçucu yağı:Tween 20 içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut analizlerinin spektrumları



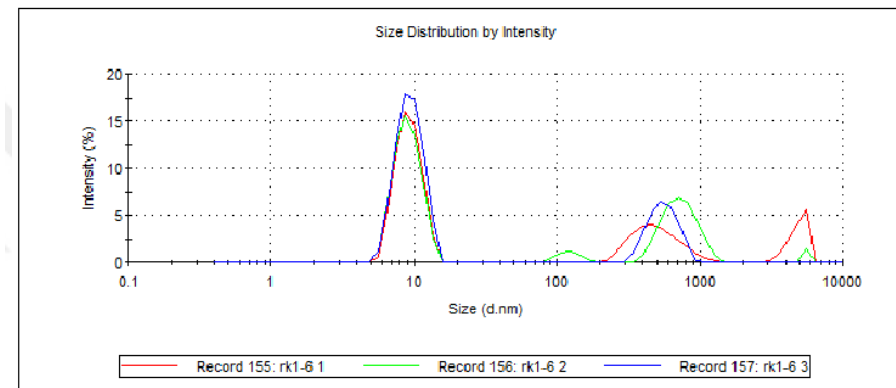
**RK1-3**



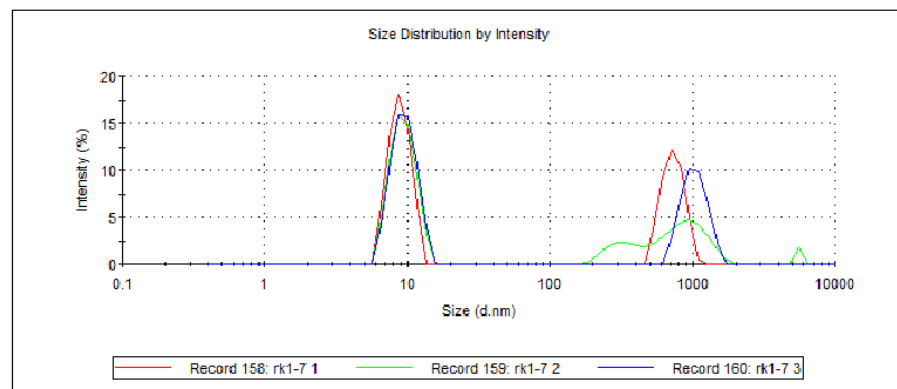
**RK1-4**



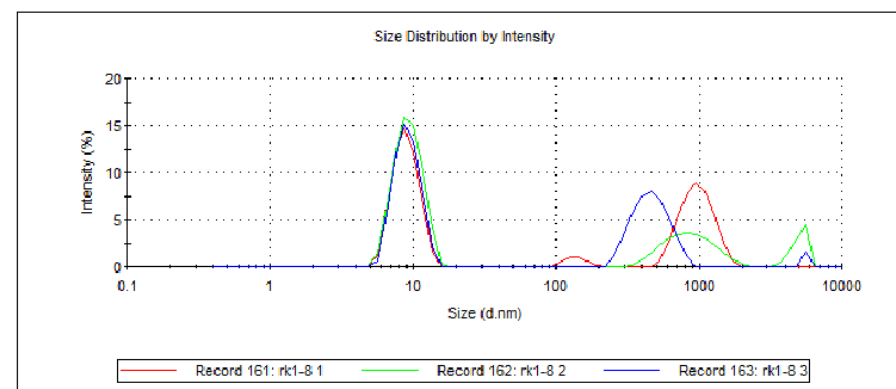
**RK1-5**



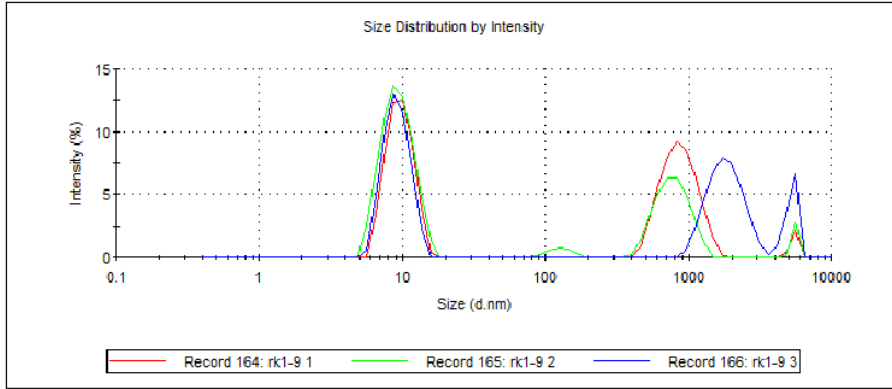
**RK1-6**



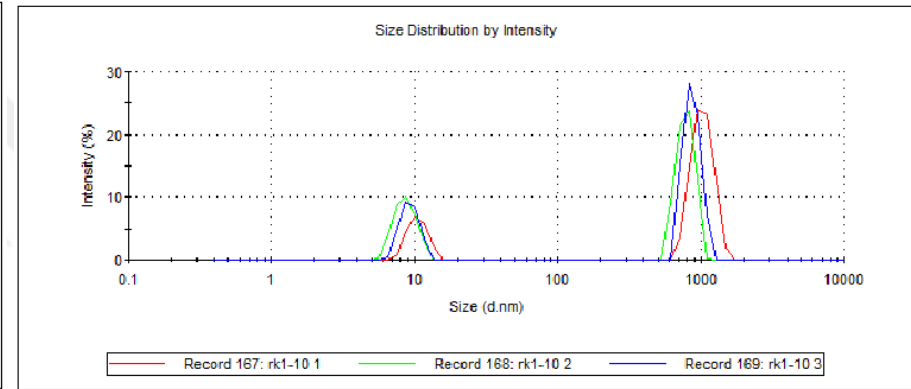
**RK1-7**



**RK1-8**

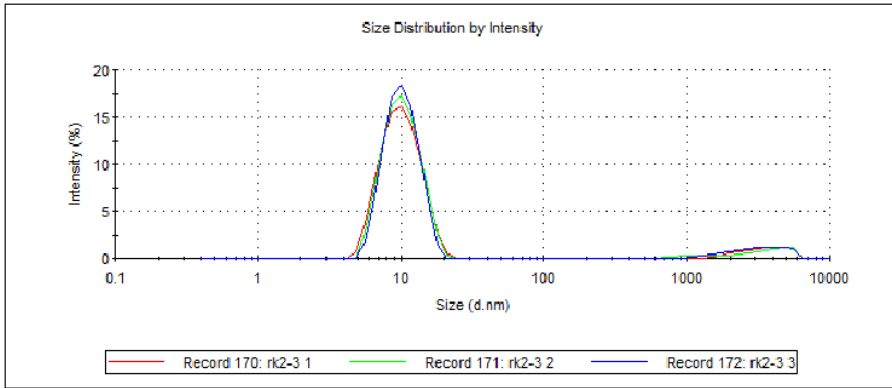


**RK1-9**

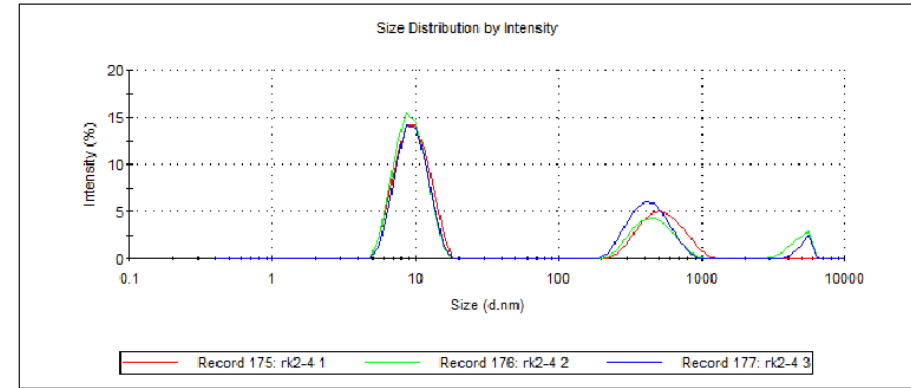


**RK1-10**

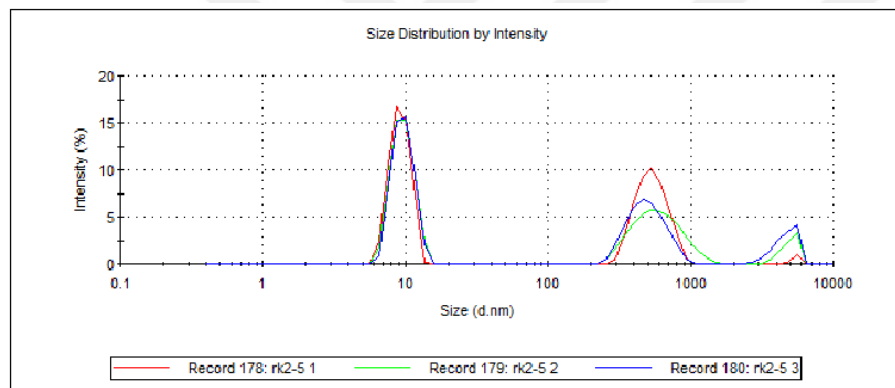
**Şekil E7.** (RK1 serisi) Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut spektrumları [Yağ:Tween 20 (1:9)]



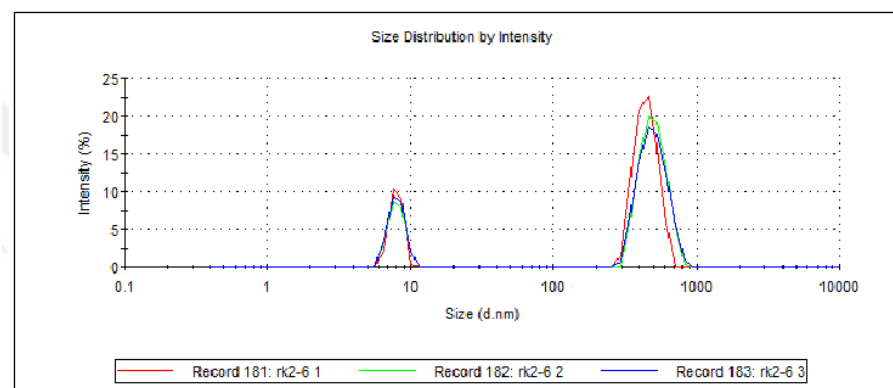
**RK2-3**



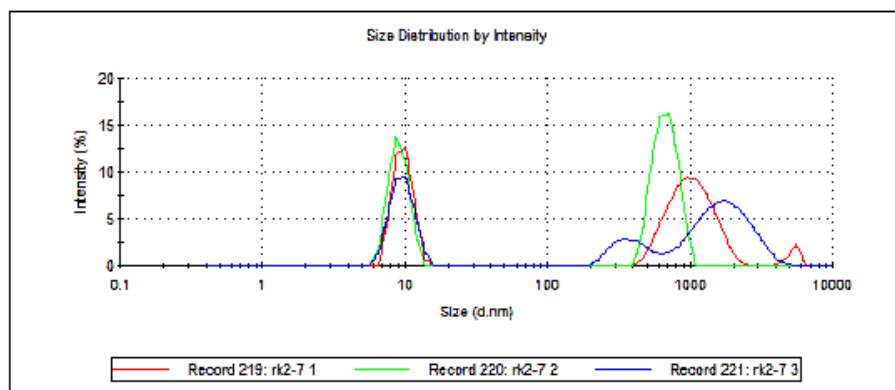
**RK2-4**



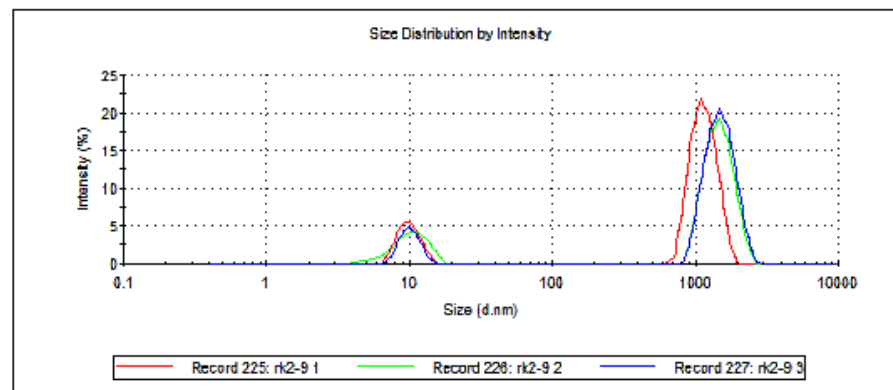
RK2-5



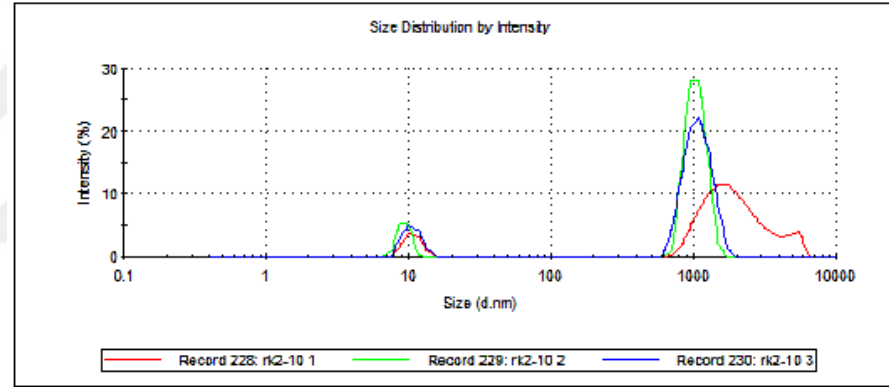
RK2-6



RK2-7

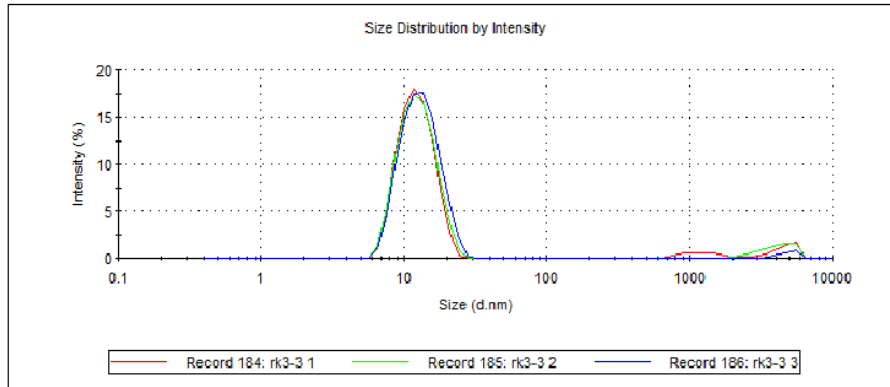


RK2-9

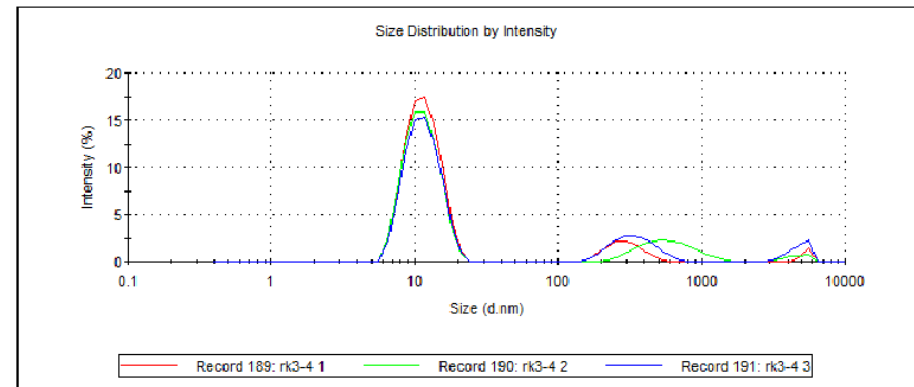


### RK2-10

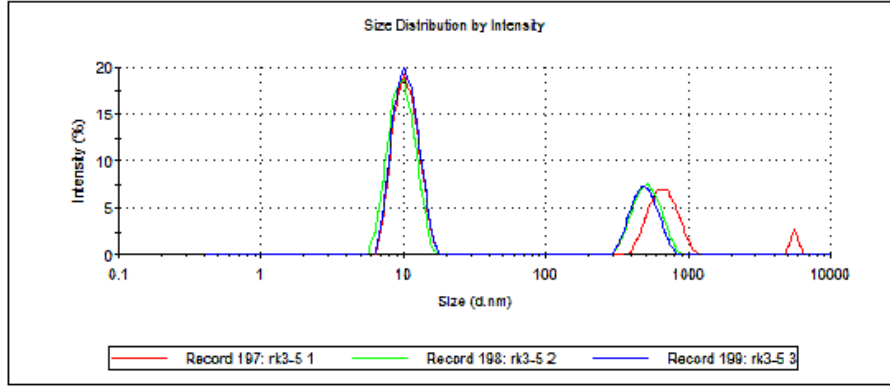
Şekil E8. (RK2 serisi) Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut spektrumları [Yağ: Tween 20 (2:8)]



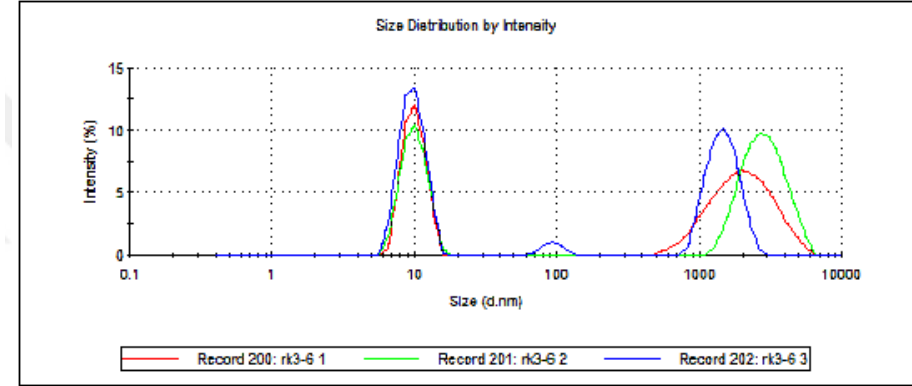
### RK3-3



### RK3-4

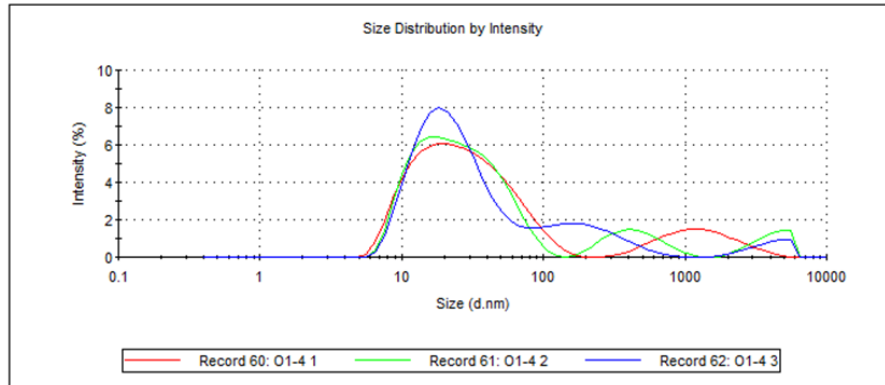


RK3-5

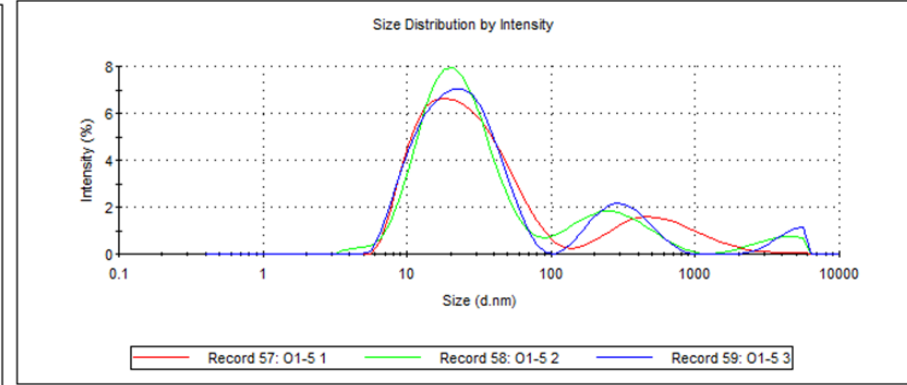


RK3-6

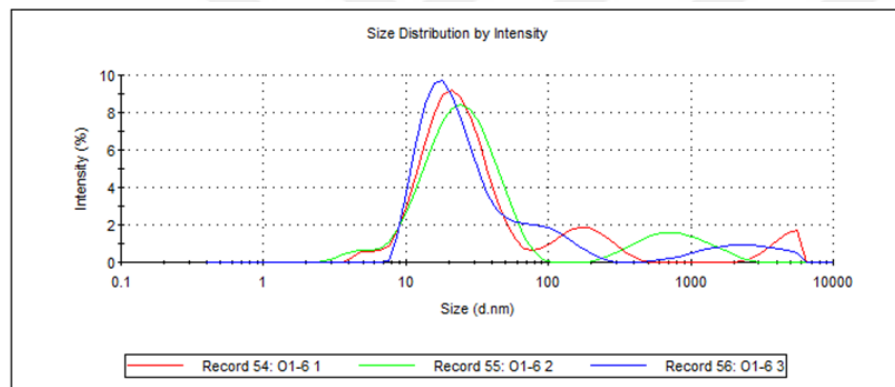
Şekil E9. (RK3 serisi) Eşit oranda biberiye uçucu yağı ve kişniş uçucu yağı içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut spektrumları [Yağ:Tween 20 (3:7)]



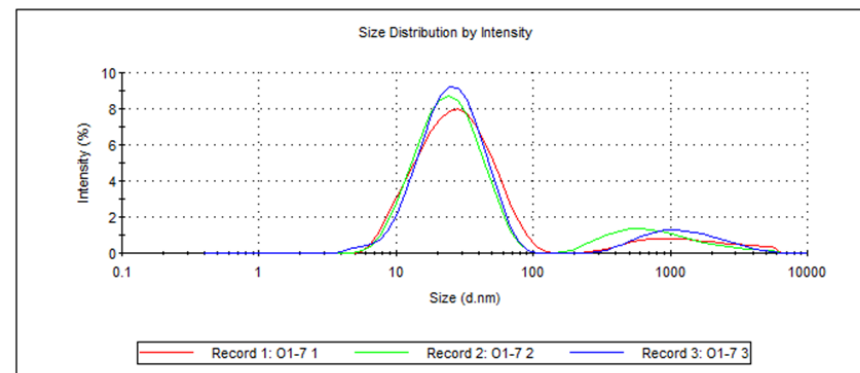
O1-4



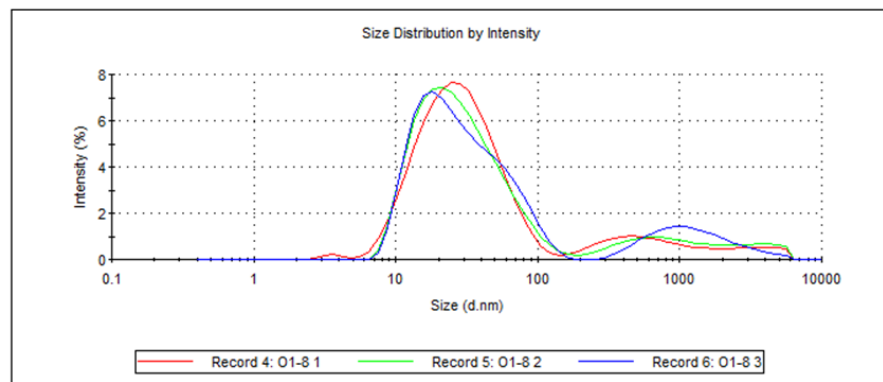
O1-5



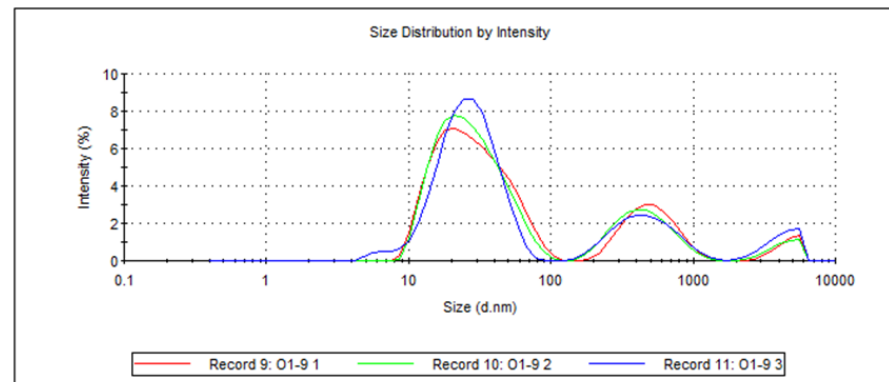
O1-6



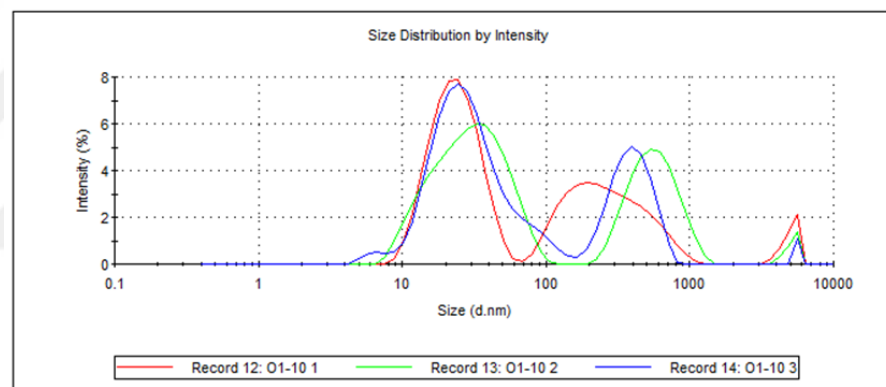
O1-7



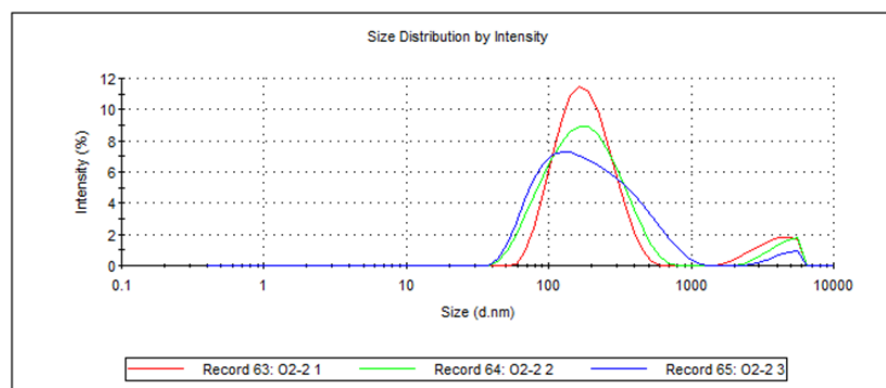
O1-8



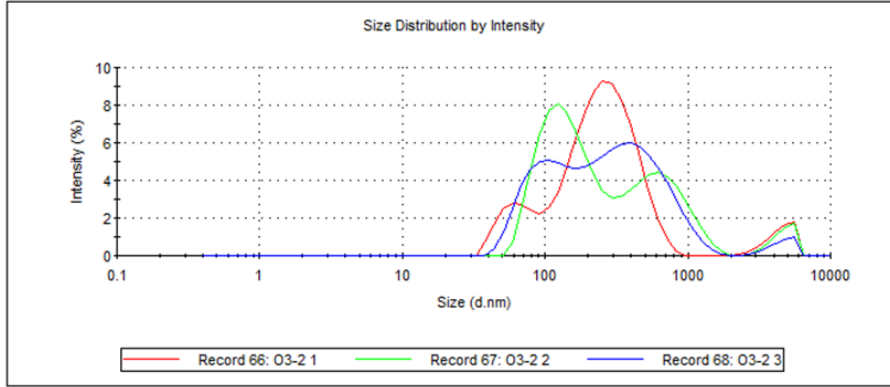
O1-9



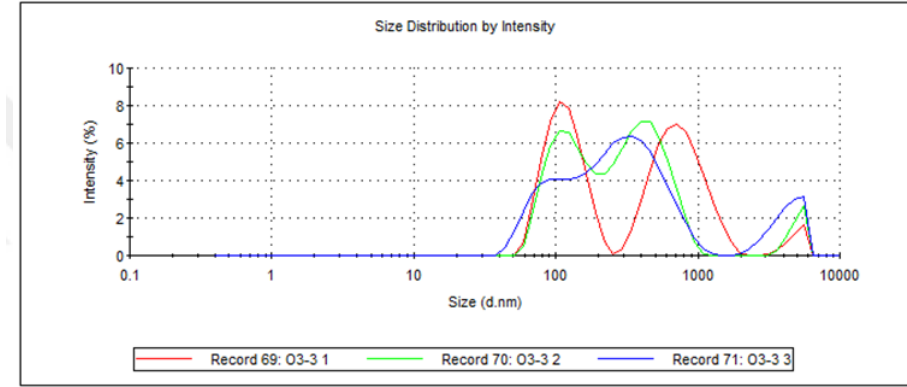
**O1-10**



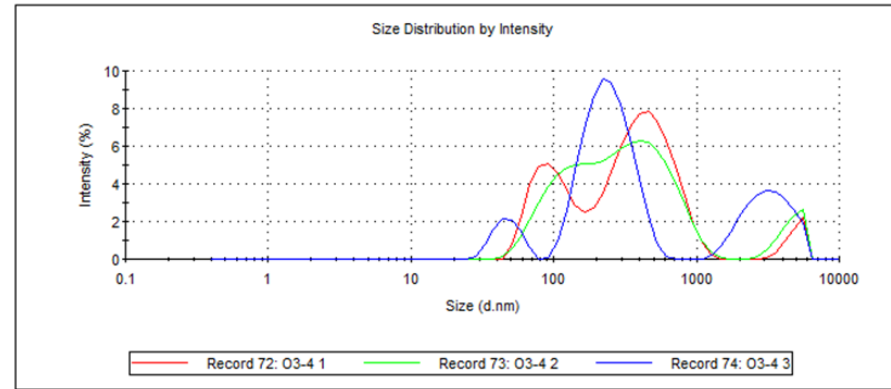
**O2-2**



O3-2

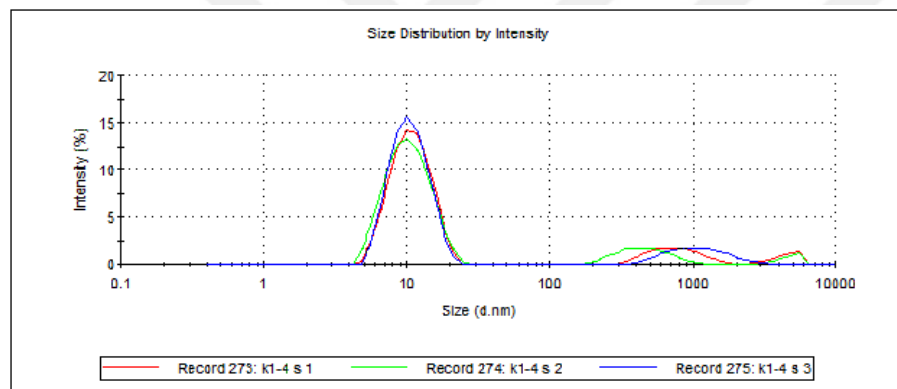


O3-3

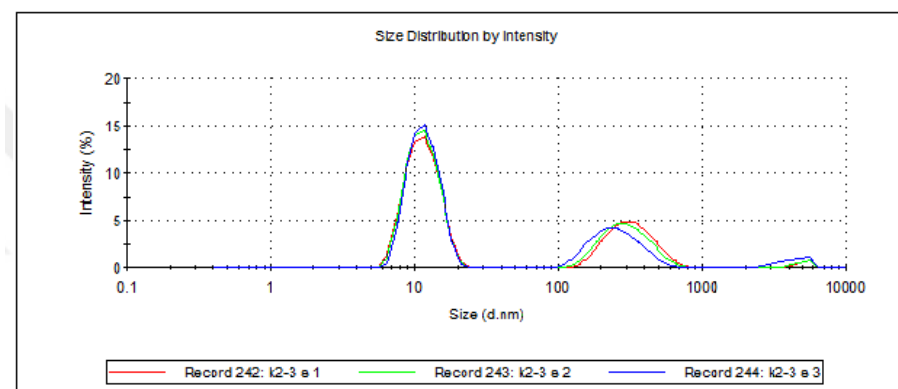


O3-4

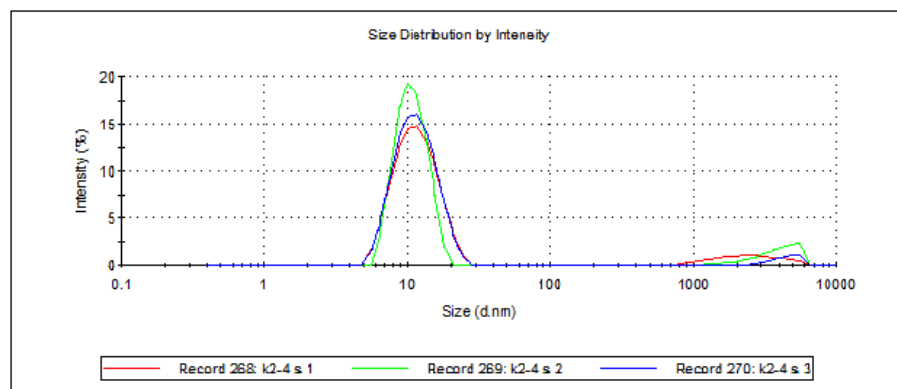
Şekil E10. (O1, O2 ve O3 serisi) Oleik asit ve Tween 20 içeren emülsiyonların stabilite çalışmaları öncesi zeta boyut spektrumları



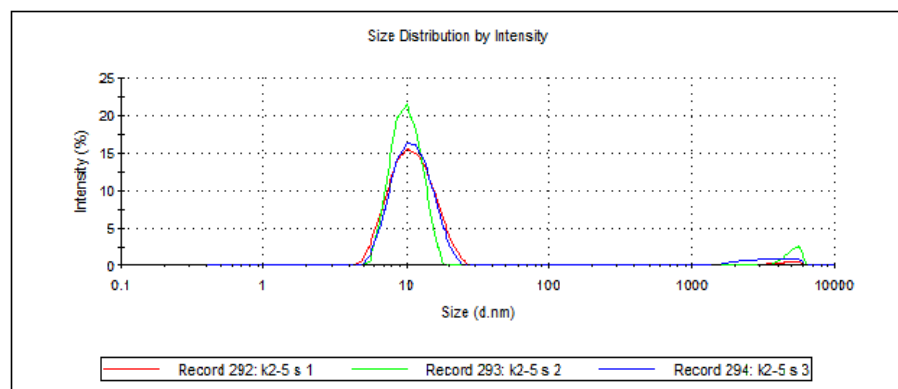
K1-4



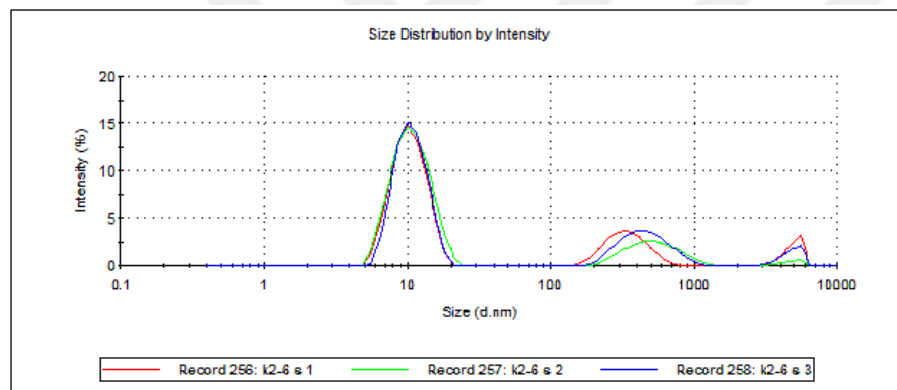
K2-3



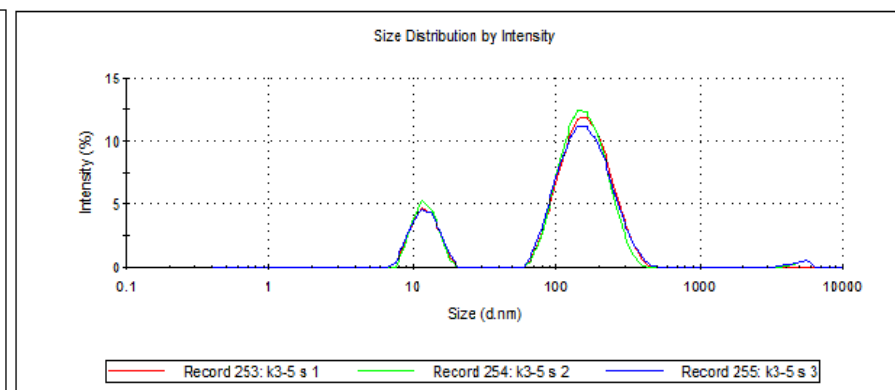
K2-4



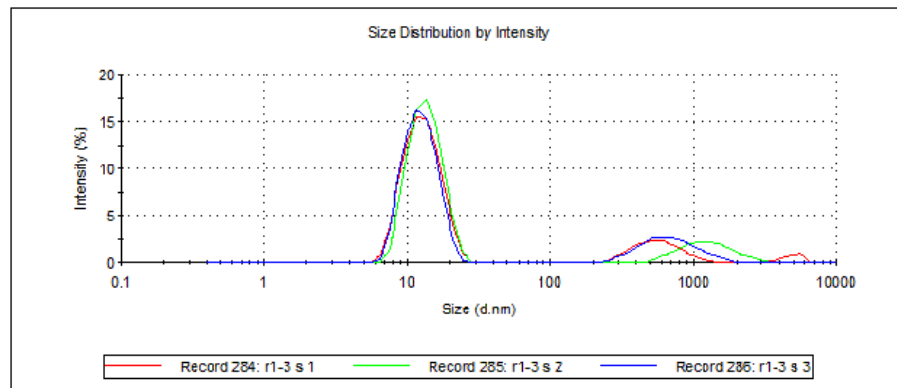
K2-5



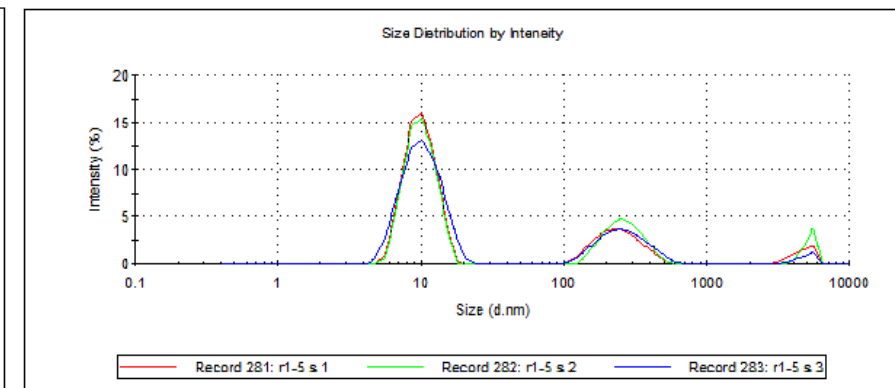
K2-6



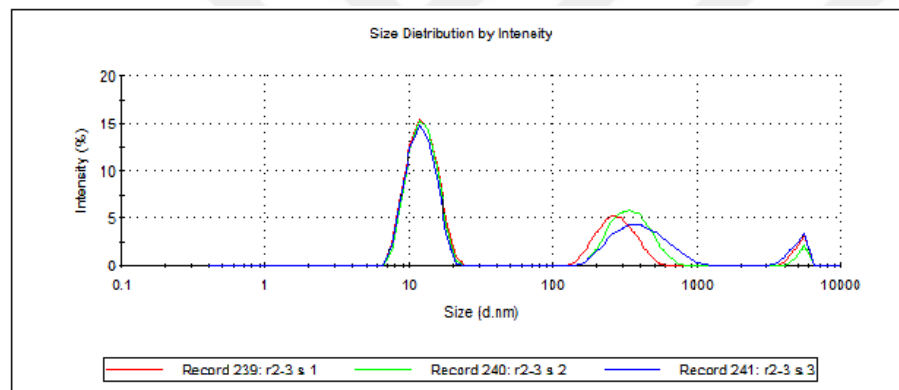
K3-5



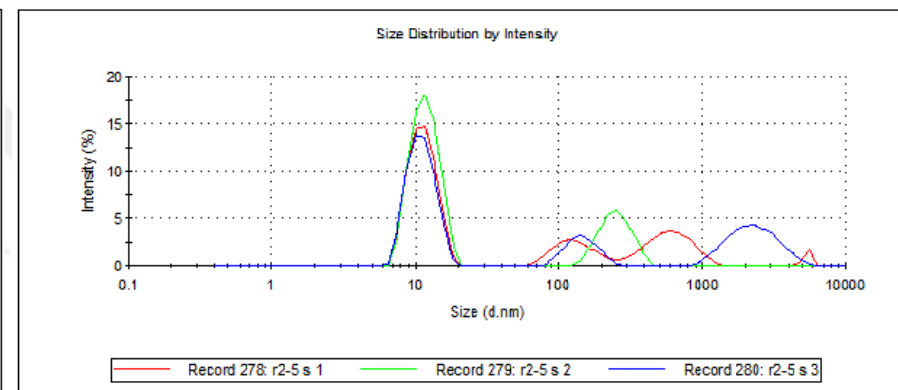
R1-3



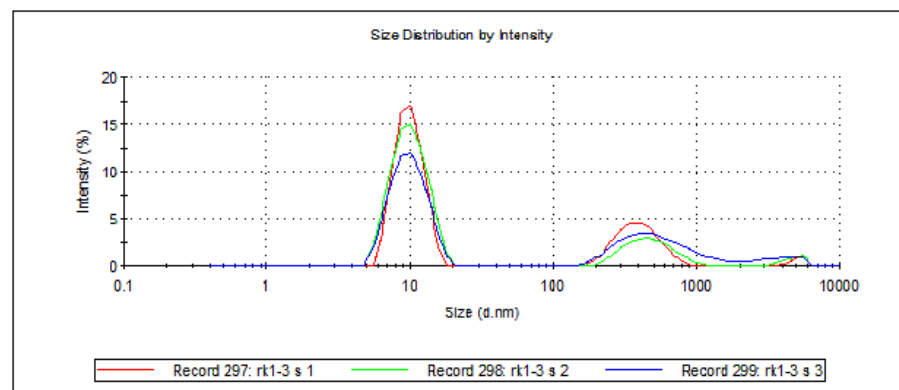
R1-5



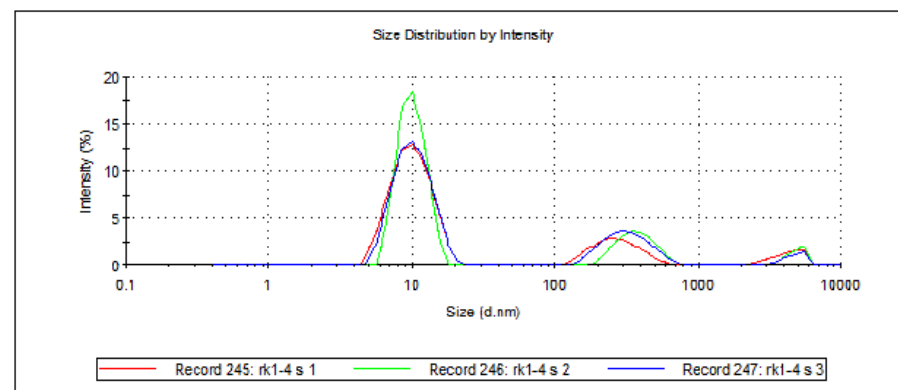
R2-3



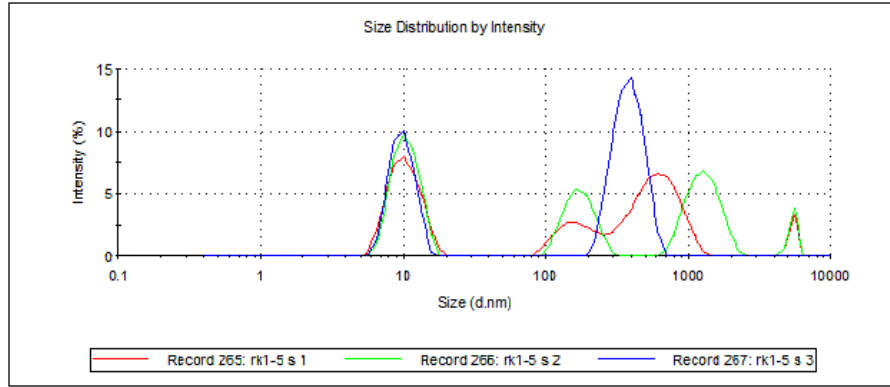
R2-5



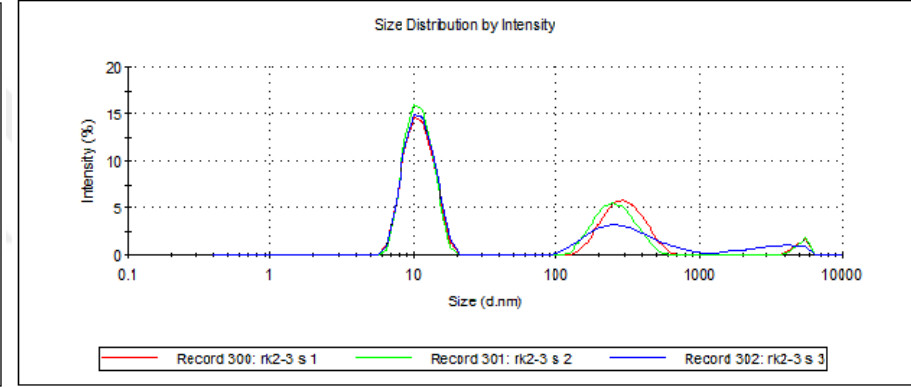
RK1-3



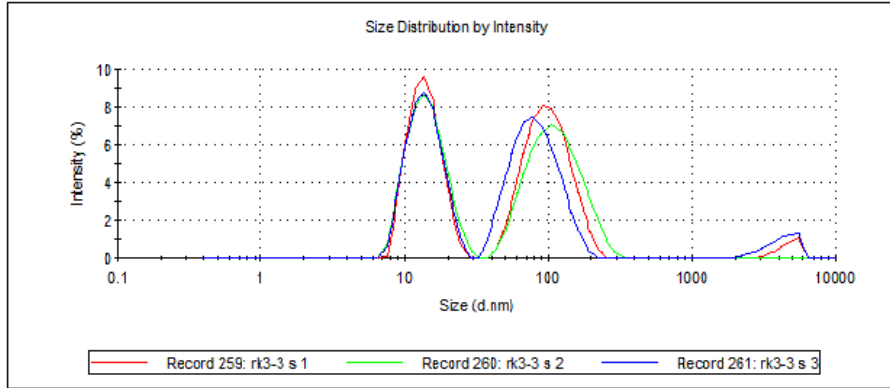
RK1-4



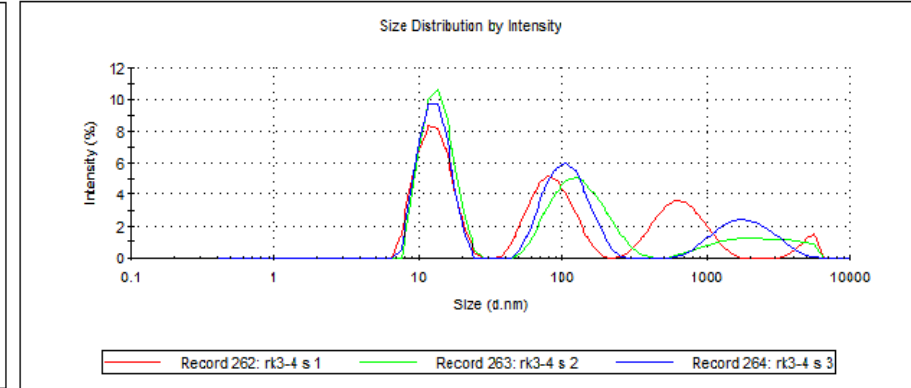
**RK1-5**



**RK2-3**



**RK3-3**



**RK3-4**

**Şekil E11.** Stabilite çalışmaları sonrasında kişniş, biberiye ve eşit oranda kişniş-biberiye uçucu yağı içeren stabil emülsiyonların zeta boyut spektrumları

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Nursenem KARACA

**Yabancı Dil:** İngilizce

**Doğum Yeri ve Yılı:** Eskişehir/1989

**E-Posta:**

**ORCID:**

### Eğitim ve Mesleki Geçmişi

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü (Biyoteknoloji ağırlıklı biyokimyagerlik)- İZMİR- (2007-2011)

Yüksek Lisans: Anadolu Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Ens.- Farmakognozi ABD.- ESKİŞEHİR- (2011-2015)

Yüksek Lisans: Anadolu Üniversitesi- Fen Bilimleri Ens.-Kimya ABD., Biyokimya BD. ESKİŞEHİR- (2015-2018)

Doktora: Anadolu Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Ens.- Farmakognozi ABD.- ESKİŞEHİR- (2015-2021)

“N Biotech Biyoteknoloji Arge San. Ltd. Şti” şirket kurucusu, Temmuz 2021.

### Burslar

Tübitak 1002, Proje no: 114S740, 2014-2015.

Tübitak 1001, Proje no: 214S129, 2016-2017.

YÖK BURS 100/2000 programı doktora bursu, 2017-2021.

Tübitak 1512 Teknogirişim Sermayesi Desteği Proje No: 2210135, 2021.

### Kurslar ve eğitim programları

Deney Hayvanları Kullanımı ile İlgili B sınıfı Eğitim Programı, 2015.

## Bildiriler

- Yetimoğlu, N., Demirci, F. ve Yeşilada, E. (2014). Sinüzit tedavisinde kullanılan bitkisel hammaddeler: Bir derleme çalışması, 21. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Ürgüp, Nevşehir.
- Yetimoğlu, N., Demirci, B., Başer, K.H.C., Demirci F. (2014). *Mentha spicata* L.ve *M. piperita* L. uçucu yağlarının bazı sinüzit patojenlerine karşı antibakteriyel etkileri. 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eskişehir.
- Yetimoğlu, N., Demirci, B., Başer, K.H.C., Demirci, F. (2014). Antibacterial evaluation of *Mentha piperita* L., *Lavandula angustifolia* L. and *Eucalyptus globulus* Labill. essential oil combinations against *Streptococcus* sp. 45th *ISEO Symposium on Essential Oils*, İstanbul.
- Karaca, N. Demirci, B. Tekin, M. Demirci, F. (2015). *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* (Limon Kokulu Kekik) Uçucu Yağının Cilt Patojenlerine Karşı *in vitro* Antimikrobiyal Etkinliği. 5. *Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi*, Antalya.
- Karaca, N., Demirci, B. ve Demirci, F. (2015). *In vitro* antibacterial effects of synergistic terpene combinations with antibiotics against rhinosinusitis pathogens. 11th *International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS-11*, Ankara.
- Karaca, N., Demirci, B. ve Demirci, F. (2015). Antibacterial effects and safety evaluation of the *Eucalyptus* essential oils by the chorioallantoic membrane (Cam) assay. *International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, DRD*, Eskişehir.
- Göger, G., Bueno, J., Karaca, N., Göger, F., Demirci, F. (2015). Inhibition of microbial oral pathogens by *Eucalyptus* sp. extracts from Turkey. 11th *International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS-11*, Ankara.
- Kırcı, D., Karaca, N. ve Demirci, B. (2017). Kozmetik açıdan *Lavandula angustifolia* L. uçucu yağının ve ana bileşenlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri. 7. *Kozmetik kimyası üretimi ve standardizasyonu kongresi*, Antalya.
- Demirci, B., Karaca, N. ve Demirci, F. (2016). Determination of anti-angiogenic effects of *Eucalyptus* essential oils on the chorioallantoic membrane (CAM). 9th *Joint Natural Products Conference*, Copenhagen, Denmark.

- Karadağ, A.E., Karaca, N., Çoban, Z., Demirci, F. (2016). *Phlomis rigida*, *P. pungens* ve *P. russeliana* toprak üstü ekstrelerinin antibakteriyel ve antihelikobakter aktiviteleri, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Ankara.
- Ağalar, H.G., Demirci, F., Karaca, N., Demirci, B. (2017). Biological activity and fatty acid compositions of *Salvia hispanica* L. seeds, *Lamiaceae*, İstanbul.
- Turan-Zitouni, G., Karaca, N. ve Demirci, F. (2017). Enzyme inhibitory evaluation of some triazolyl-thiazole derivatives, *17th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry*, Aristotle University of Thessaloniki.
- Turan-Zitouni, G., Karaca, N., Levent S., Demirci, F. (2017). Synthesis of hydrazone derivatives containing a benzothiazole moiety and biological evaluation, 17th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki.
- Demirci, F., Karaca, N., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2016). Combination of essential oils with antibacterial agents against sinusitis pathogens, *International Symposium on Natural Products for the Future*, Tokushima, Japan.
- Karaca, N., Şener, G., Demirci, B., Demirci, F. (2017). Synergistic antibacterial combination of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil with camphor, *International Symposium Essential Oils (ISEO)*, İstanbul.
- İçen, M.S., Karaca, N., Demirci, F., Gürbüz, İ. The antimicrobial activity of liquid-liquid fractions from *Marrubium cuneatum* Banks & Sol. *Uluslararası Katılımlı Tıbbi, Aromatik ve Boya Bitkileri Sempozyumu (REYHAN 2017)*, Malatya.
- Karaca, N., Demirci, B., Demirci, F. (2017). Uçucu yağ nanoemülsiyonlarının antibakteriyel ve antienflamatuvar etkinliklerinin incelenmesi, *Uluslararası Katılımlı 19. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir.
- Sönmez, E., Köse, Y.B., Demirci, B., Karaca, N., Demirci, F. (2017). Biological activities of the essential oils of *Ajuga reptans* L. and *Ajuga reptans* P.H. Davis (Lamiaceae) from Turkey. *International Symposium: Advances in Lamiaceae*, Antalya.
- Demirci, F., Karaca, N., Kilic, C.S., Duman, H, Gurbuz, I. (2018). Evaluation of enzyme inhibitory activity of ethanolic extracts of the roots of two *Ferulago* spp. *ISOPS 12*, Ankara.
- Karaca, N. ve Demirci, F. (2019). *In vitro* evaluation of rosemary and coriander essential oil combination nanoemulsions targeting the cholinesterase and lipoxygenase, *6. World Congress on Medicinal and Aromatic Plants, WOCMAP19*, Antalya.

- Gokmen, A., Kúsz, N., Karaca, N., Demirci, F., Hohmann, J., Kirmizibekmez, H. (2017). Bioactivities of *Verbascum bugulifolium* and isolation of secondary metabolites. *Planta Med. International Open*, 4(S 01), Tu-PO.
- Demirci, F., Karaca, N., Demirci, B., Öztürk, G., Baser, K. H. C. (2018). *In vitro* antimicrobial and anti-mycobacterial activity of *Piper nigrum* Linn. essential oil. *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology*, 16(1), 143.

## Yayınlar

- Kirmizibekmez, H., Karaca, N., Demirci, B., Demirci, F. (2017). Characterization of *Sideritis trojana* Bornm. essential oil and its antimicrobial activity. *Marmara Pharm. J.*, 21(4), 860-865.
- Kirmizibekmez, H., Kúsz, N., Karaca, N., Demirci, F., Hohmann, J. (2017). Secondary metabolites from the leaves of *Digitalis viridiflora*. *Nat. Prod. Commun.*, 12(1), 59-61.
- Karaca, N., Demirci, B. ve Demirci, F. (2018). Evaluation of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* L., *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* L. essential oils and their main components against sinusitis pathogens. *Z. Naturforsch. C.*, 73(9-10), 353-360.
- Demirci, F., Karaca, N., Tekin, M., Demirci, B. (2018). Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens. *Microb. Pathog.*, 122, 117-121.
- Karaca, N. ve Ünlüer, Ö.B. (2019). Albumin Based Nanoparticles for Detection of Pancreatic Cancer Cells. *Protein Pept. Lett.*, 26(4), 271-280.
- Kirmizibekmez, H., Erdoğan, M., Kúsz, N., Karaca, N., Erdem, U., Demirci, F., Hohmann, J. (2019). Secondary metabolites from the aerial parts of *Sideritis germanicopolitana* and their *in vitro* enzyme inhibitory activities. *Nat. Prod. Res.*, 35(4), 655-658.
- Poyraz, M., Sari, M., Berber, H., Karaca, N., Demirci, F. (2019). Synthesis, characterization and x-ray crystal structure of the new schiff base and anticandidal evaluation. *J. Chem. Soc. Pak.*, 41(6), 1090-1096.
- Gökmen, A., Kúsz, N., Karaca, N., Demirci, F., Hohmann, J., Kirmizibekmez, H. (2020). Secondary metabolites from *Verbascum bugulifolium* Lam. and their bioactivities. *Nat. Prod. Res.*, 35(23), 5294-5298.

- Türe, N., Yıldırım, C., Pınarbaşı, Ö., Özüdoğru, E., Cingi, C., Demirci, F., Karaca, N. (2021). An Investigation into the degree of sinus mucosal delivery of inhaled black cumin volatile and peppermint essential oils. *J. Med. Food*, 24(11), 1206-1212.
- Karaca, N., Şener, G., Demirci, B., Demirci, F. (2021). Synergistic antibacterial combination of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil with camphor. *Z. Naturforsch. C.*, 76(3-4), 169-173.
- Gür Maz, Z.T. , Karaca, N., Levent, S., Çalışkan, B., Demirci, F., Banoğlu, E., (2021). Synthesis and evaluation of antibacterial and antimycobacterial activities of some new pyrazole derivatives. *J. Res. Pharm. Pract.*, 25(5), 531-539.

