



**T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

***ULVA LACTUCA* EKSTRAKTININ LİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN
ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra AK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

OCAK 2023

T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ULVA LACTUCA EKSTRAKTININ LİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN
ANTİOKSİDAN VE ANTİBAKTERİYAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra AK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL

Eş Danışman: Doç. Dr. İnci TÜNEY KIZILKAYA

OCAK 2023

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 220Y003 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 220Y003 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Esra Ak

İmzası :

[Faint, stylized signature watermark]

ÖNSÖZ	Error! Bookmark not defined.
KISALTMALAR	vii
SEMBOLLER	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Lipozomların Yapısı	2
1.1.1 Lipozomların sınıflandırılması	5
1.1.2 Lipozom hazırlama yöntemleri	6
1.1.2.1 Geleneksel yöntemler	6
1.1.2.2 Yeni yöntemler	8
1.1.3 Lipozom hazırlamada kullanılan fosfolipitler	10
1.1.3.1 Doğal lipitler	10
1.1.3.2 Sentetik lipitler	12
1.1.4 Lipozom karakterizasyon yöntemleri	12
1.1.4.1 Parçacık boyutu	12
1.1.4.2 Zeta potansiyeli	13
1.1.4.3 Enkapsülasyon verimliliği	14
1.1.4.4 Lamellarite	14
1.2 Makroalglerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması	15
1.2.1 <i>Ulva lactuca</i> ve genel özellikleri	17
1.2.1.1 <i>Ulva lactuca</i> türünün antioksidan etkinliği	18
1.2.1.2 <i>Ulva lactuca</i> türünün antibakteriyel etkinliği	20
1.3 Antioksidan Etkinliği Belirlemede Kullanılan Metotlar	22
1.3.1 HAT esaslı analiz yöntemleri	22
1.3.1.1 β -karoten veya crocin-bleaching testi	22
1.3.1.2 Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)	23
1.3.1.3 Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)	24
1.3.2 ET esaslı analiz yöntemleri	24
1.3.2.1 Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi	24
1.3.2.2 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) tayini	26
1.3.2.3 Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü	26
1.3.2.4 DPPH radikal süpürme aktivite tayini	26
1.3.2.5 CUPRAC (bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi	28
1.4 Antibakteriyel Etkinliği Belirlemede Kullanılan Metotlar	29
1.4.1 Difüzyon testleri	29
1.4.1.1 Agar disk difüzyon testi	29
1.4.1.2 Agar kuyusu difüzyon yöntemi	30
1.4.1.3 Antimikrobiyal gradyan yöntemi (E test)	30
1.4.2 Dilüsyon testleri	30
1.4.2.1 Broth dilüsyon yöntemi	31
1.4.2.2 Agar dilüsyon yöntemi	32
1.5 Çalışmanın Amacı	33
1.6 Hipotez	33
2. MATERYAL METOT	34

2.1 Materyal	34
2.2 Metot	35
2.2.1 <i>U. lactuca</i> alg örneğinin ekstraksiyonu	35
2.2.2 Lipozom eldesi	36
2.2.3 Ekstre yüklü lipozom formülasyonunun hazırlanması	37
2.2.4 Enkapsülasyon verimliliği hesaplama	37
2.2.5 Total fenolik madde (TPC) tayini	37
2.2.6 Antioksidan madde kapasite tayini	39
2.2.6.1 Ekstrenin DPPH radikal süpürme aktivitesi	39
2.2.6.2 Lipozomal formülasyonun DPPH radikal süpürme aktivitesi	40
2.2.7 Antibakteriyel testler	41
2.2.7.1 Kullanılan mikroorganizmalar ve besiyerleri	41
2.2.7.2 Disk difüzyon testi	41
2.2.7.3 MİK ve MBK testleri	41
2.2.8 Örneklerin karakterizasyonunun yapılması	43
2.2.8.1 Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi	43
2.2.8.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntü analizi	43
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	44
3.1 Ekstre Yüklü Lipozom Formülasyonunun Enkapsülasyon Verimliliğinin Hesaplanması	44
3.2 Örneklerin Karakterizasyonunun Yapılması	44
3.3 Ekstrelerin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	49
3.4 Ekstre Ve Ekstre Yüklü Lipozom Formülasyonunun DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi	51
3.5 Ekstre Ve Ekstre Yüklü Lipozom Formülasyonunun Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi	55
3.5.1 Disk difüzyon testi ile inhibisyon çapının belirlenmesi	55
3.5.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerlerinin saptanması	57
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	80

KISALTMALAR

AAPH	: 2, 2'-azobis – 2 – metil - propanimidamit, dihidroklorür
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
CFU	: Koloni oluşturan birimler
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DOPC	: 1,2-diöleoil-sn-gliserol-3-fosfokolin
DOPE	: 1,2-diöleoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin
DOPG	: Diöleoil fosfatidilgliserol
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EE	: Enkapsülasyon verimliliği
ET	: Tek elektron transferi
FC	: Folin-Ciocalteu
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GUV	: Dev tek lamelli vezikül
HAT	: Hidrojen atomu transferi
LDV	: Lazer doppler hız ölçümü
LUV	: Büyük tek lamelli vezikül
MBK	: Minimum bakterisidal konsantrasyonu
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MLV	: Çok katmanlı vezikül
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
OLV	: Oligo-lamelli vezikül
ORAC	: Oksijen radikal absorban kapasitesi
PALS	: Faz analizi ışık saçılımı
PC	: Fosfatidilkolin
PDI	: Polidispersite indeksi

PE	: Fosfatidiletanolamin
PS	: Fosfatidilserin
R-PE	: Rphycoerythrin
RSE	: Radikal süpürme verimliliği
SAXS	: Küçük açılı X-ışını saçılımı
SEC	: Boyut dışlama kromatografisi
SM	: Sfingomyelin
SUV	: Küçük tek lamelli vezikül
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TPC	: Toplam fenolik içerik
TRAP	: Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
ULV	: Tek katmanlı vezikül

SEMBOLLER

EC₅₀ : Yarı maksimal etkili konsantrasyon
Tt : Faz geçiş sıcaklığı



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 : Ekstrelerin enkapsülasyon verimliliği (%).....	44
Çizelge 3.2 : Boş lipozom, ekstre ve ekstre yüklü lipozomların boyut dağılımı, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksleri	49
Çizelge 3.3 : <i>Ulva lactuca</i> Marmara ve Ege alg ekstrelerine ait TPC (mg GAE/g) değerleri	51
Çizelge 3.4 : Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların % İnhibisyon değerleri.....	55
Çizelge 3.5 : Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların inhibisyon çapları.....	56
Çizelge 3.6 : Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların MİK ve MBK değerleri.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Lipozomun yapısı.....	3
Şekil 1.2 : Lipozomların sınıflandırılması.....	5
Şekil 1.3 : Doğrudan prob sonikatör sistemi	10
Şekil 1.4 : <i>Ulva lactuca</i> türünün morfolojisi	17
Şekil 1.5 : Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesini gösteren diyagram	25
Şekil 1.6 : Bir antioksidan tarafından DPPH temizleme mekanizması	27
Şekil 1.7 : Agar disk difüzyon testi	29
Şekil 1.8 : Broth mikrodilüsyon yöntemi	32
Şekil 2.1 : Alg materyalinin toplanması	35
Şekil 2.2 : Liyofilize ekstrenin elde edilme aşamaları	35
Şekil 2.3 : Prob uçlu sonikatör sistemi ve lipozom eldesi	36
Şekil 2.4 : Gallik asit kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 2.5 : MİK deney dizaynı	42
Şekil 3.1 : Boş lipozomların boyut dağılımı	45
Şekil 3.2 : Boş lipozomların zeta potansiyeli	45
Şekil 3.3 : Boş lipozomların SEM görüntüsü	45
Şekil 3.4 : Ege ekstresinin boyut dağılımı	46
Şekil 3.5 : Ege ekstresinin zeta potansiyeli	46
Şekil 3.6 : Ege ekstresinin SEM görüntüsü	46
Şekil 3.7 : Ege ekstre yüklü lipozomun zeta potansiyeli	47
Şekil 3.8 : Ege ekstre yüklü lipozomun SEM görüntüsü	47
Şekil 3.9 : Marmara ekstresinin boyut dağılımı	47
Şekil 3.10 : Marmara ekstresinin zeta potansiyeli	48
Şekil 3.11 : Marmara ekstrelerine ait SEM görüntüsü	48
Şekil 3.12 : Marmara ekstre yüklü lipozomların boyut dağılımı	48
Şekil 3.13 : Marmara ekstre yüklü lipozomların zeta potansiyeli	49
Şekil 3.14 : Marmara ekstre yüklü lipozomun SEM görüntüsü	49
Şekil 3.15 : <i>Ulva lactuca</i> Marmara alg materyalinin TPC'ye ait renk değişimi	50
Şekil 3.16 : <i>Ulva lactuca</i> Ege alg materyalinin TPC'sine ait renk değişimi	50
Şekil 3.17 : DPPH radikali eklenmeden önce ekstrelerin görünümü	51
Şekil 3.18 : DPPH radikali eklendikten 1 saat sonraki renk değişimi	52
Şekil 3.19 : İnkübasyon süresi sonunda <i>Ulva lactuca</i> Marmara ve Ege ekstrelerinin kontrol ile karşılaştırılması	52
Şekil 3.20 : <i>Ulva lactuca</i> Marmara ve Ege ekstrelerin Radikal Süpürme Aktivitesi (%)	53
Şekil 3.21 : <i>Ulva lactuca</i> Marmara ve Ege ekstrelerinin EC ₅₀ değerleri	54
Şekil 3.22 : Marmara ekstresinin <i>E. coli</i> ATCC 25922 (a) ve <i>S. aureus</i> ATCC 25923(b)'a karşı disk difüzyon test sonuçları	56
Şekil 3.23 : Ege ekstresinin <i>E. coli</i> ATCC 25922 (a) ve <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (b)'a karşı disk difüzyon test sonuçları	56

Şekil 3.24 : Marmara ekstresinin <i>E. coli</i> ATCC 25922'ye karşı MİK testi.....	58
Şekil 3.25 : Marmara ekstresinin <i>S. aureus</i> ATCC 26923'e karşı MİK testi	58
Şekil 3.26 : Ege ekstresinin <i>E. coli</i> ATCC 26922'ye karşı MİK testi	59
Şekil 3.27 : Ege ekstresinin <i>S. aureus</i> ATCC 26923'e karşı MİK testi.....	60
Şekil 3.28 : Marmara ekstre yüklü lipozomun <i>E. coli</i> ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)	61
Şekil 3.29 : Marmara ekstresinin <i>E. coli</i> ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d).....	62
Şekil 3.30 : Marmara ekstre yüklü lipozomun <i>S. aureus</i> ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)	62
Şekil 3.31 : Marmara ekstresinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d).....	63
Şekil 3.32 : Ege ekstre yüklü lipozomun <i>E. coli</i> ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)	63
Şekil 3.33 : Ege ekstresinin <i>E. coli</i> ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d).....	64
Şekil 3.34 : Ege ekstre yüklü lipozomun <i>S. aureus</i> ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)	64
Şekil 3.35 : Ege ekstresinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d).....	65

ULVA LACTUCA EKSTRAKTININ LİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN ANTIÖKSİDAN ve ANTİBAKTERİYAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Deniz marulu olarak da bilenen *Ulva lactuca* (*Ulvophyceae*; *Ulvaceae*), kayalık ve sığ sularda gelişen, dünya üzerinde geniş yayılım gösteren bir yeşil makroalg türüdür. *U. lactuca*, alkaloid, flavonoid, tanen, steroid, saponin ve antrakinon gibi biyoaktif bileşikler içermekte ve antioksidan ve antimikrobiyal etkiler başta olmak üzere sağlık üzerinde birçok olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir.

Diğer yandan lipozomlar biyoyoumlu, toksik etkisi olmayan ve biyobozunur özelliklere sahiptir ve farmasötik, gıda, kimya ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Uygulama alanına göre farklı kompozisyona ve fiziksel özelliklere sahip olmakla birlikte bir çok farklı hazırlama metodu vardır. Lipozomlar amfipatik yapıya sahip olmalarından dolayı hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşikler enkapsüle edebilir. Belirli bir salınım profiline bağlı olarak kontrollü salınım yapılabilir. Hedefe özgü ligandlarla modifiye edilebilme özelliklerine sahip olan lipozomlar hedef bölgeyle entegrasyonun artmasını sağlamaktadır. Ayrıca terapötik maddeyi vücut içerisinde metabolize olmaktan korumakta ve böylelikle terapötik maddelerin etkinliğinin artmasına sebep olmaktadır.

Bu tez çalışmasında *U. lactuca* türünün Marmara (Bursa) ve Ege (İzmir) denizlerinden toplanan alg materyallerinin Bursa Teknik Üniversitesi ve Ege Üniversitesi'nde ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon işlemi Etanol/Su (80/20 V/V) çözücüsüyle 40 °C sıcaklıkta ve oda sıcaklığında iki ayrı metot ile gerçekleştirildi. Elde edilen ekstre ve ekstre yüklü lipozomal formülasyonların antioksidan ve antibakteriyel özellikleri araştırıldı. Ekstre ve ekstre yüklü lipozomal formülasyonların antioksidan kapasitesinin anlaşılabilmesi için, total fenolik içerikleri (TPC) Folin Ciocioultiou yöntemi ile ve antioksidan aktivitesi DPPH radikal süpürme aktivitesi tayini ile araştırıldı. Folin Ciocioultiou metodu ile total fenolik içerik tayini sonuçlarına göre 100 µg/mL konsantrasyonda; Marmara ekstresinin TPC'si 5,306 mg GAE/g olarak hesaplanırken, Ege ekstresinin TPC'si ise 7,5 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Marmara ve Ege ekstrelerinin EC₅₀ değerleri

sırasıyla 429,21 µg/mL ve 834,29 µg/mL olarak hesaplanırken bu değerler standart antioksidan askorbik asite kıyasla yaklaşık 30 ila 60 kat daha yüksektir.

U. lactuca ekstresinin antibakteriyel etkisi için öncelikle disk difüzyon testi yapıldı. Ardından Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) testleri ile antibakteriyel aktiviteleri değerlendirildi. Disk difüzyon testinde her bir ekstre ve ekstre yüklü lipozom için 8 mm inhibisyon çapı belirlenirken, MİK testinde *U. lactuca* Marmara ve Ege ekstrelerinin lipozomal formülasyonları *E.coli* ATCC 25922'ye karşı MİK değeri 1250 µg/mL olarak belirlendi. Her iki örneğin de *S. aureus* ATCC 25923'e karşı daha etkisiz olduğu bulundu ve MİK değerleri 2500 µg/mL idi. MİK testinde, ekstre yüklü lipozomların antibakteriyel etkisinin ekstrele kıyasla daha yüksek olduğu bulundu. MBK değerlerine ise, MİK değerlerinden daha yüksek konsantrasyonlarda ulaşılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: *Ulva lactuca*, Antioksidan aktivite, Antibakteriyel aktivite, Lipozom.

**INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL
PROPERTIES OF LIPOSOMAL FORMULATION OF *ULVA LACTUCA*
EXTRACT**

SUMMARY

Ulva lactuca (Ulvophyceae; Ulvaceae), also known as sea lettuce, is a green macroalgae species that grows in rocky and shallow waters and spreads widely around the world. *U. lactuca* contains bioactive compounds such as alkaloids, flavonoids, tannins, steroids, saponins and anthraquinones and is known to have many positive effects on health, including antioxidant and antimicrobial effects.

On the other hand, liposomes have biocompatible, non-toxic and biodegradable properties. Liposomes are used in the pharmaceutical, food, chemistry and cosmetic industries. Although it has different composition and physical properties according to the application area, there are many different preparation methods. Because of their amphipathic nature, liposomes can encapsulate both hydrophobic and hydrophilic compounds. Depending on a particular release profile, controlled release can be made. Liposomes, which have the ability to be modified with target-specific ligands, increase the integration with the target region. In addition, it protects the therapeutic agent from the metabolism system in the body, thus increasing the effectiveness of the therapeutic agent.

In this thesis study, algae materials of *U. lactuca* collected from Marmara (Bursa) and Aegean (İzmir) seas were extracted at Bursa Technical University and Ege University. Extraction was carried out with Ethanol/Water (80/20 V/V) solvent at 40 °C and room temperature with two separate methods. The antioxidant and antibacterial properties of the obtained extract and the extract-loaded liposomal formulations were investigated. In order to understand the antioxidant capacity of extracts and extract-loaded liposomal formulations, their total phenolic content was investigated by Folin Ciocioultiou method and antioxidant activity was investigated by DPPH radical scavenging activity. According to the results of the total phenolic content determination with the Folin Ciocioultiou method, at a concentration of 100 µg/mL; TPC of Marmara extract was calculated as 5.306 mg GAE/g, while TPC of

Aegean extract was found as 7.5 mg GAE/g. The EC₅₀ values of Marmara and Aegean extracts were calculated as 429.21 µg/mL and 834.29 µg/mL, respectively. These values are approximately 30 to 60 times higher than the standard antioxidant ascorbic acid.

For the antibacterial effect of *U. lactuca* extract, firstly, disk diffusion test was performed. Then, their antibacterial activities were evaluated with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBK) tests. In the disk diffusion test, inhibition zone were 8 mm was determined for each sample, while the liposomal formulations of *U. lactuca* Marmara and Aegean extracts were determined as 1250 µg/mL against *E.coli* ATCC 25922 in the MIC test. Both samples were found to be less effective against *S. aureus* ATCC 25923 and had MIC values of 2500 µg/mL. In the MIC test, it was found that the antibacterial effect of the extract-loaded liposomes was higher than the extracts. It was concluded that MBK values could be reached at higher concentrations than MIC values.

Keywords: *Ulva lactuca*, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Liposome.



1. GİRİŞ

Günümüzde sentetik antioksidan ve antibakteriyel maddeler, maliyet sebebiyle ticari olarak daha çok tercih edilmekle birlikte bunların insan sağlığı üzerinde yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Artık tüketiciler bilinçli hale gelmiş ve içeriği temiz ürünler daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır. Bu nedenle doğal antioksidan ve antibakteriyel katkı maddeleri, nihai ürünü tüketiciye daha güvenli ve kaliteli şekilde ulaştırabilmek için cazip seçenekler haline gelmiştir.

Bu noktada alger oldukça ilgi çekici seçenek olmuşlardır. Hali hazırda birçok ticari üründe alger kullanılmaktadır. Birçok kültürde gıda olarak tüketilmelerinin yanı sıra kozmetik ve ilaç sektörlerinde de uygulamaları mevcuttur. Alglerin bu kadar ilgi çekmesinin nedeni, antioksidan, antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiviral), antitümör, antienflammatuar gibi insan sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahip olmalarıdır. Bu etkiler, yüksek sıcaklık ve yüksek tuzluluk dalgalanmaları, sabit güneş ışığı, yüksek oksijen konsantrasyonu gibi zorlu koşullara maruz kaldıklarında gelişebilmek adına ürettikleri ikincil metabolitlerden kaynaklanmaktadır.

Gıda, kozmetik, ilaç ve sağlık alanlarında sentetik maddeler yerine doğal bileşenler üzerine gidilmesi gerekmektedir. Doğal bileşenler kaynağını yine canlı sistemlerden aldığı için çok daha güvenilir kaynaklardır.

İlaç ve sağlık alanlarında tedavilerde kullanılacak ürünlerin temel amaçlarından biri, yan etkilerini en aza indirirken ilacın terapötik indeksini artırmaktır. Terapötik maddelerin yararlılığını sınırlayan durumlar hedef dokuya ulaşamamaları ve bazı dokularda oluşturduğu toksik yan etkilere, Hedef bölgeye seçici teslimat sağlayarak bu zorlukların üstesinden gelmek için farklı yaklaşımlar yapılmıştır. İdeal çözüm, ilacı tek başına hastalıktan etkilenen hücrelere, dokulara, organlara hedeflemek olacaktır. Seçilen taşıyıcılar, örneğin koloidal partiküller ve moleküler konjugatlar, bu belirleme için uygun olabilir. Koloidal partiküller, örneğin ters miseller, noizom, mikro ve nano küreler, eritrositler ve polimerler ve lipozomlar gibi, ilacın partiküllü bir koloidal sisteme fiziksel olarak dahil edilmesinden kaynaklanır.

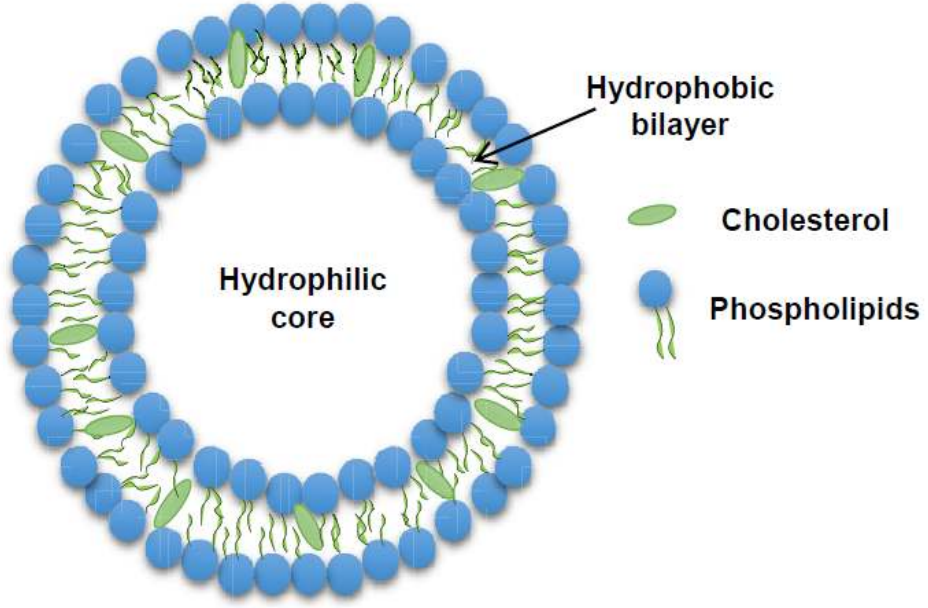
Bu taşıyıcılar arasında en çok araştırılanlar lipozomlardır. Lipozomların çekiciliği, biyobozunur ve biyouyumlu kılan bileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Lipozom, doğal veya sentetik lipidlerden oluşan bir veya daha fazla çift katman tarafından tutulan sulu bir çekirdek içerir. Biyolojik olarak inert ve zayıf immünojenik olan doğal fosfolipidlerden oluşurlar ve düşük doğal toksisiteye sahiptirler. Ayrıca, farklı polariteye sahip ilaçlar birlikte lipozomlarla enkapsüle edilebilir. (Akbarzadeh ve diğ., 2013).

Ulva lactuca (Ulvophyceae; Ulvaceae), deniz marulu olarak da bilinen ve dünyada yaygın olarak bulunan yassı yeşil makroalg türüdür. Gıda, tarım, farmakoloji ve tıp alanlarındaki uygulamalarda en kullanışlı deniz yosunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca diğer makroalg türleri gibi Türkiye denizlerinde yaygın dağılıma sahiptir (Durmaz ve ark. 2008). *U. lactuca* ekstrelerinin güçlü antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri olduğu birçok çalışmada ortaya koyulmuştur.

Bu tez çalışmasında *U. lactuca* alg materyalinden elde edilen etanolik ekstreinin lipozom ile kapsüllenerek antibakteriyel etkinliği ve antioksidan kapasitesi araştırılmıştır. Ayrıca lipozomal formülasyon ile ekstrelerin biyoaktivitelerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Son olarak lipozomal formülasyonun karakterizasyonu yapılmıştır.

1.1 Lipozomların Yapısı

Lipozomlar ilk olarak 1960'lı yılların başında Alec D. Bangham tarafından keşfedilmiştir. Temel olarak hücre zar yapısında bulunan lipit ve yağ asitlerinden meydana gelen lipozomlar, çok küçük boyutlara sahip, küresel şekildeki yapay veziküllerdir. Fosfolipidler, hem hidrofilik baş grubuna hem de hidrofobik yağ asidi zincirine sahip oldukları için doğaları gereği amfipatiktirler. Amfipatik moleküller, hidrofilik baş gruplarının dış sulu ortama baktığı ve hidrokarbon zincirlerinin hidrofobik iç kısımda toplandığı tek veya çok katmanlı çift katlı bir küre halinde kendiliğinden bir araya gelmesiyle lipozom yapısı meydana gelir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 : Lipozomun yapısı (Nsairat ve diğ., 2022)

Lipozomları çekici hale getiren özellikleri biyobozunur ve biyoyumlu olmalarıdır. Bu özelliklerinin yanısıra hidrofilik ve hidrofobik uçlu yapıları lipozomları etkili enkapsülasyon ve taşıyıcı olmaları konusunda ön plana çıkarır.

Lipozomlar biyoaktif bileşenleri, temel olarak biyoyumlulukları, biyobozunur kararlılıkları, sentezlenme kolaylıkları, yüksek ilaç yükleme etkinlikleri, yüksek biyoyararlanımları ve bu formülasyonlarda kullanılan güvenli yardımcı maddeler nedeniyle yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerdir (Nsairat ve diğ., 2022).

Lipozomlar, çok çeşitli biyoaktif bileşenler için çok yönlü ve gelişmiş nano dağıtım sistemlerini temsil eder. Nanolipozom teknolojisi ise stabiliteyi korumak, salınımı kontrol etmek ve biyoyararlanımlarını arttırmak için hedef bileşiklerin tutulmasında etkili bir yöntemdir (Khorasani ve diğ., 2018). Toksik olmayan bu sistemler, amfifilik karakteri, onları farklı polaritelerdeki biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonu önemli bir potansiyele sahiptir (Koudelka ve diğ., 2012).

İlaçların lipozomal enkapsülasyonu, sistemik toksisiteyi azaltır ve antikanser, antibakteriyel ve antifungal tedaviler için tolere edilebilir doz rejimlerini iyileştirir (Koudelka ve diğ., 2012).

Lipozom özellikleri, lipid bileşimi, yüzey yükü, boyut ve hazırlama yöntemi ile önemli ölçüde değişir (Akbarzadeh ve diğ., 2013). Bu nedenle boyutlarına ve çift katmanlı sayısına göre üç sınıfa ayrılırlar. Ayrıca, çift tabakalı bileşenlerin seçimi, çift tabakanın "sertliğini" (veya "akışkanlığını") ve yükünü belirler. Örneğin, dipalmitoilfosfatidilkolin gibi uzun asil zincirlerine sahip doymuş fosfolipitler sert, oldukça geçirimsiz bir çift tabakalı yapı oluştururken, doğal kaynaklardan (yumurta veya soya fasulyesi fosfatidilkolin) doymamış fosfatidilkolin türleri çok daha fazla geçirgen ve daha az kararlı çift tabakalar verir (Sahoo ve diğ., 2003).

Pozitif veya negatif yüklü lipitlerin eklenmesi, lipozomlara bir yüzey yükü sağlar. Lipozomlarla ilişkili ilaçlar, çözelti halindeki ilaçlarla karşılaştırıldığında belirgin şekilde değişen farmakokinetik özelliklere sahiptir. Ayrıca sistemik toksisiteyi azaltmada ve kapsüllenmiş ilacın hedef organizmaya girdikten sonra erken bozunmasını önlemede etkilidirler (Gabizon ve diğ., 1988).

Lipozomlar, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde çok sayıda molekül için taşıyıcı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, düşük toksisiteleri ve hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları yakalama ve tümör dokularına bölgeye özgü ilaç dağıtımını basitleştirme yetenekleri nedeniyle, lipozomların hem araştırma sistemi olarak hem de ticari ilaç dağıtım sistemi olarak kullanım oranı artmıştır (Akbarzadeh ve diğ., 2013).

İlaç yükleme ya pasif olarak (yani ilaç lipozom oluşumu sırasında kapsülendir) ya da aktif olarak (yani lipozom oluşumundan sonra) elde edilebilir. Hidrofobik ilaçlar, vezikül oluşumu sırasında doğrudan lipozomlar halinde birleştirilebilir ve alım ve tutma miktarı, ilaç-lipid etkileşimleri tarafından yönetilir. %100'lük yakalama etkinliği genellikle elde edilebilir, ancak bu, ilacın lipozom membranındaki çözünürlüğüne bağlıdır. Suda çözünen ilaçların pasif kapsülendirilmesi, lipozomların vezikül oluşumu sırasında çözünmüş bir ilaç içeren sulu tamponu tutma yeteneğine bağlıdır. Enkapsülasyon etkinliği (genellikle <%30), lipozomlarda sınırlandırılan hapsolmuş hacim ve ilaç çözünürlüğü ile sınırlıdır. Öte yandan, protonize edilebilir amin fonksiyonlarına sahip suda çözünür ilaçlar, pH gradyanları kullanılarak aktif olarak tutulabilir, bu da %100'e yaklaşan yakalama etkinliği ile sonuçlanabilir (Akbarzadeh ve diğ., 2013).

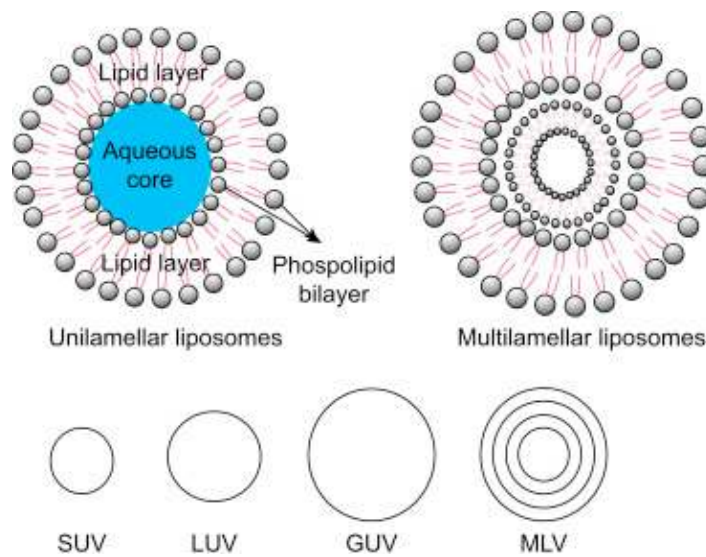
Lipozomal dağıtım sistemleri, bir ürünün terapötik etkinliğini, onu etki alanına ulaştırarak ve minimum etkili seviyeleri daha uzun süre koruyarak artırabilir (Weiss ve Fintelman, 2000).

1.1.1 Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomların vezikül boyutu 0,025 - 2,5 μm boyutları arasında değişebilir. Ayrıca lipozomlar bir veya iki katmanlı zarlara sahip olabilir. Vezikül boyutu, lipozomların sirkülasyon yarı ömrünün belirlenmesinde akut bir parametredir ve hem boyut hem de çift tabaka sayısı, lipozomlardaki ilaç kapsülleme miktarını etkiler (Ajeeshkumar ve diğ., 2021; Nagalingam, 2017). Sentez yöntemi, üretilen lipozomların tipini belirler (Large ve diğ., 2021). Boyutlarına göre; küçük ve büyük, katmanlarına göre; tek tabakalı, çift tabakalı veya çok katmanlı olarak sınıflandırılmaktadır. Lipozomların sınıflandırılması Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Katman sayısına göre;

Tek Katmanlı Veziküller (ULV): Tek katmanlı veziküller ayrıca üç kategoriye ayrılabilir; küçük tek lamelli veziküller (20–100 nm çapında, SUV'ler), büyük tek lamelli veziküller (100 nm-1 μm , LUV'ler) ve dev tek lamelli veziküller (>1 μm , GUV'ler)

Çok Katmanlı Veziküller (MLV): Çoklu lipid çift katmanlarının varlığı ile karakterize edilir.



Şekil 1.2 : Lipozomların sınıflandırılması (Nagalingam, 2017)

1.1.2 Lipozom hazırlama yöntemleri

Lipozomların hazırlanması için birçok farklı yöntem vardır. Uygun yöntemin seçimi birkaç faktöre bağlıdır. Bunlar; lipozom bileşenlerinin ve yüklenecek ilacın fizikokimyasal özellikleri; yüklenen maddenin toksisitesi ve konsantrasyonu; lipozomların dağıldığı ortamın türü; lipozomların uygulanması/teslimatı sırasındaki ek işlemler; başarılı uygulama için istenen boyut ve yarı ömür; ve klinik amaçlı büyük ölçekli üretime ilişkin maliyetler, tekrarlanabilirlik ve uygulanabilirlik ve iyi üretim uygulamalarıyla ilgili konulardır (Bozzuto ve Molinari, 2015). Lipozomlar, çeşitli geleneksel ve yeni teknikler kullanılarak hazırlanabilir. Lipozomların yapı görünümü ve stabilitesi, sentezi için benimsenen teknoloji ile yüksek oranda ilişkilidir (Ajeeshkumar ve diğ., 2021).

Lipozomal preparasyonda, fosfolipidlerin faz geçiş sıcaklığı (T_t) kritik bir faktördür. T_t'nin üzerinde, fosfolipidler, fosfolipidlerin hidrofobik kuyruklarının lipozomlar oluşturmaya hazır olduğu sıvı kristal fazda görünür. Sıcaklık T_t'nin altına düşerse, fosfolipidler jel halinde ortaya çıkar ve bu tür koşullarda hidrofobik kuyruklar sıkı bir şekilde paketlenmiş lipozom oluşumunu sağlayamaz (Alam ve diğ., 2017).

1.1.2.1 Geleneksel yöntemler

İnce film hidrasyonu

Lipozom sentezi için kullanılan en yaygın yöntem ince film hidrasyonudur. Kısaca, bu yöntem lipidin bir organik çözücü içinde çözülmesini, çözücünün buharlaştırılmasını ve elde edilen lipid filminin sulu ortamda dağıtılmasını içerir (Bozzuto ve Molinari, 2015). Hidrasyon hızı ne kadar yavaş olursa, kapsülleme verimliliği o kadar yüksek olur (Large ve diğ., 2021). Ayrıca lipid filmini hidratlamak için büyük hacimde sulu çözelti kullanılması MLV'lerin oluşmasına yol açar (Large ve diğ., 2021). Diğer lipozom türleri (örn., SUV'ler ve LUV'ler), bu MLV'lerden ya yüksek yoğunluklu bir ultrasonik hücre bozucu ile sonikasyon (SUV hazırlığı için) ya da ekstrüzyon yöntemi (SUV ve LUV hazırlığı için) kullanılarak hazırlanabilir (Sturm ve Ulrih, 2021). Tekniğin en büyük avantajı, yüksek kapsülleme oranları sağlayan, doğrudan yaklaşımlı basit bir işlemdir (Ajeeshkumar ve diğ., 2021). Bununla birlikte, bu yöntemle ilgili en büyük dezavantaj, büyük miktarda organik çözücü kullanımı, zaman alıcı ve sıklıkla gerekli sterilizasyon

nedeniyle çözücü kalıntısının varlığıdır (Leitgeb ve diğ., 2020; Wagner ve Vorauer-Uhl, 2011).

Ters fazlı buharlaşma

Ters fazlı buharlaşma, proteinler ve nükleik asitler gibi büyük moleküllerin kapsüllenmesine izin veren büyük sulu hacimleri yakalayan bir LUV ve MLV karışımı üretir (Akbarzadeh ve diğ., 2013). Bu yöntemde, lipidler ve amfifilik moleküller önce organik bir çözücü içinde karıştırılır, daha sonra karışıma çözünürleştirilmiş bir ilaç içerebilen sulu bir tampon eklenir (Szoka ve Papahadjopoulos, 1978). Daha sonra, organik çözücü düşük basınç altında döner bir buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırılır ve lipid vezikülleri sulu çözelti içinde dağılmış halde bırakılır (Large ve diğ., 2021). Daha küçük, daha düzgün parçacıklar elde etmek isteniliyorsa, lipozomların boyutu ekstrüzyonla azaltılabilir ve bu durumda polikarbonat filtrenin gözenek boyutu ve ekstrüzyon döngülerinin sayısı sentezlenen lipozomların boyutunu ve polidispersitesini belirleyecektir (Szoka ve diğ., 1980). Tekniğin ana dezavantajı, kapsüllenecek malzemelerin organik çözücülerle ve kısa süreli sonikasyonla temasıdır (Akbarzadeh ve diğ., 2013).

Enjeksiyon

Etanol veya eter enjeksiyonu, lipozom oluşumu için önemli bir yöntemdir, burada inorganik fazda çözünmüş lipit materyali, lipozomlar oluşturmak üzere sulu ortama enjekte edilir (Wagner ve diğ., 2006). Bu teknik, ince film hidrasyonundan daha yüksek kapsülleme verimliliğini garanti eder (Bozzuto ve Molinari, 2015).

Bu yöntem, büyük hacimlerde lipozomal formülasyonlar hazırlamak için uygundur. Bununla birlikte, fabrikasyon lipozomlar genellikle daha yüksek polidispersite indekslerine (PDI) sahiptir, bu da geniş bir boyut dağılımına işaret eder ve birçok durumda MLV'ler mevcut olabilir (Large ve diğ., 2021).

Deterjan uzaklaştırma

Deterjan uzaklaştırma yöntemi, bir lipit filmin bir deterjan çözeltisi ile hidrasyonunu içerir ve büyük MLV'lerin oluşumunu sağlar (Bozzuto ve Molinari, 2015). Tanecik boyutunu kontrol etmek için basit bir işlemdir ve homojen yapıya sahip ürün verir. Bu tekniğin başlıca dezavantajları zaman alıcı, son ürünlerdeki artık safsızlıklar ve

deterjanın kapsüllenmiş bileşik ile etkileşimidir (Schubert, 2003). Ayrıca, deterjanın seyreltme yoluyla uzaklaştırılması sırasında hidrofobik bileşikler için daha düşük enkapsülasyon verimliliği gözlemlenmiştir (Meure ve diğerleri, 2008).

Ekstrüzyon yöntemi

SUV'leri oluşturmak için MLV'lerin bir Fransız basınç hücresinden ekstrüzyon işlemi yapılarak gerçekleştirilir. Yüksek basınç, küçük gözenek boyutlu polikarbonat filtreler aracılığıyla veziküllerin ekstrüzyonuna yardımcı olur (Ajeeshkumar ve diğ., 2021). Uygulanan basınç, döngü sayısı ve kullanılan filtrenin gözenek boyutu, ekstrüde edilmiş lipozomun ortalama çapı ve polidispersitesi gibi özellikleri etkileyen parametrelerdir. Bu yöntem basit, hızlı, tekrarlanabilir ve nispeten homojen boyut dağılımları gösterir (Ong ve diğ., 2016). Yöntemin dezavantajları arasında, yüksek sıcaklığa ulaşmanın zorluğu (Anwekar ve diğ., 2011), gözeneklerin tıkanması, ürün kaybı ve büyük ölçekli üretimde sınırlama yer alır (Leitgeb ve diğ., 2020).

1.1.2.2 Yeni yöntemler

Süperkritik akışkan yöntemi

Süper kritik sıvı ekstraksiyonu teknolojisi, işleme yöntemlerinde ScCO_2 gibi süper kritik sıvıları kullanan yeşil bir teknolojidir. Organik çözücülerin yerini alabilecek toksik olmayan malzeme olarak ScCO_2 kullanımının, ilaç sektörlerinde ilaçların mikro ve nanokapsülasyonu için umut verici uygulamalar olduğu kanıtlanmıştır (Trucillo ve diğ., 2019). Geleneksel buharlaştırma yöntemlerine kıyasla daha az çözücü kullanımı, süper kritik akışkan yöntemlerinin ana cazibesidir. Dezavantajları arasında, özellikle yüksek maliyet ve baskı içermesi, karmaşık enstrümanların kullanımı bulunmaktadır (Nkanga ve diğ., 2019).

Mikroakışkanlaştırma yöntemi

Bu teknik, mikroakışkanlaştırıcı odasının içindeki akışa yol açan, küçük bir açıklık boyunca bölünmüş bir basınç akımı kullanan, termal olmayan bir işleme tekniği olarak kabul edilir (Devrim ve diğ., 2016). Sonikasyon, deterjanlar ve toksik kimyasallar kullanmadan sürekli veya tekrarlanabilir bir şekilde büyük miktarlarda lipozomlar üretebilir (Tabatabaei ve diğ., 2016). Mikroakışkan teknolojisi,

homojenlik ile istenen boyutta daha küçük homojen ULV'ler sunar (Ajeeshkumar ve diğ., 2021). Ayrıca, tekrarlanabilirlik ve üretim sonrası işlem adımlarının azaltılması (Al-Amin ve diğ., 2020) başka bir avantaj olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin küçük dezavantajı, işlem sırasında yüksek basınç uygulanmasıdır.

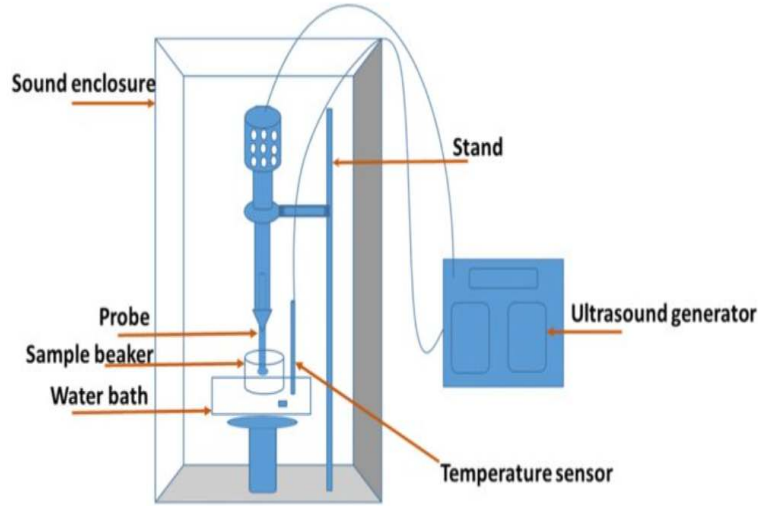
Sonikasyon

Sonikasyon, ultrasonik dalgaların kullanıldığı, lipozomların hazırlanması için yaygın olarak tercih edilen yeşil teknolojilerden biridir (Ajeeshkumar ve diğ., 2021).

Sonikasyon yöntemi, 16 ile birkaç yüz kHz'e kadar çıkan ultrasonik ses dalgalarıyla örnek içerisinde küçük oyuklar oluşturarak çalışır. Ultrasonik ses dalgaları ile büyük boyutlu lipozomlar parçalanır, böylece LUV ve SUV'ler elde edilir (Payne ve diğ., 1986 ; Taylor ve diğ., 2005).

Uygulama süresi ve basınç dalgalarının yoğunluğu hazırlanan veziküllerin boyutunu belirleyen anahtar parametrelerdir (Cho ve diğ., 2013). Doğrudan prob sonikasyonu ve banyo sonikasyonu iki ana sonikasyon yöntemidir.

Doğrudan prob sistemleri (Şekil 1.3), lipit dağılımına doğrudan daldırılmış paslanmaz çelik veya titanyum bir proba bağlı bir ultrasonik jeneratörden oluşur (Taylor ve diğ., 2005). Bu tür bir sistem, sisteme çok yüksek enerjiler iletebilir ve genellikle daha küçük veziküller üretir. Yüksek enerji girişi nedeniyle aşırı ısınma meydana gelebilir ve doğru sıcaklık kontrolü genellikle zordur (Papahadjopoulos ve diğ., 1967). Probdaki enerji eşleşmesi, yerel sıcaklıkla sonuçlanır; bu nedenle kap bir su/buz banyosuna daldırılmalıdır. (Akbarzadeh ve diğ., 2013). Doğrudan prob uçlar, banyo tipi sistemle karşılaştırıldığında bu sistem ile daha küçük boyutlu partikül elde etmek mümkündür. Bu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajlar da mevcuttur. Sonikasyon uygulanan solüsyonda enerji dağılımı homojen değildir. Bu nedenle, partikül boyutları daha çeşitlidir. Tekrarlanabilirlik düşüktür. Ayrıca, yüksek yoğunluklu ultrasonun etkisi altında probun metal ucunun nihai bozunması, enzimler gibi fonksiyonel bileşenlere müdahale edebilecek sistemdeki metal iyonu konsantrasyonlarında artışlara yol açabilir (Papahadjopoulos ve diğerleri, 1967).



Şekil 1.3 : Doğrudan prob sonikatör sistemi (Desai ve diğ., 2021)

Banyo sonikatörleri, lipozomların üretimi için tercih edilen sistemlerdir, çünkü sistem boyunca oldukça tekbiçimli bir enerji dağılımına sahiptirler, bu da tek biçimli ve tek modlu parçacık boyutu dağılımlarına sahip lipozomların oluşumuyla sonuçlanır (Papahadjopoulos ve diğ., 1967). Prob uç sonikasyonun aksine, bu yöntemde lipid dağılımının sıcaklığını kontrol etmek genellikle daha kolaydır (Sahil ve diğ., 2011). Ayrıca prob sonikatörlerdeki metal uç ile kontaminasyon riski solüsyon ile temas olmadığı için banyo tipi sonikatörlerde yoktur. Banyo sonikatörlerinin dezavantajı direkt uç sonikatörlerine kıyasla sisteme daha düşük enerji vermeleridir.

Tüm bunlar göz önüne alındığında banyo tipi sonikatörler, MLV ve MVV veya mikro boyutlarda LUV oluşturmak için daha uygunken; doğrudan prob sonikatörler ise nano boyutlu LUV ve SUV üretimi için daha idealdir (Kırtıl ve Öztop, 2014).

1.1.3 Lipozom hazırlamada kullanılan fosfolipitler

1.1.3.1 Doğal lipitler

Lipitler, hidrofilik bir ana grubu ve hidrofobik, hidrokarbon kuyruğunu paylaşan çok çeşitli bir yapıya sahiptir. Ana grup negatif yüklü, pozitif yüklü veya zwitteriyonik olabilir. Ana grup ayrıca diğer moleküllerle konjugasyona izin vermek için kimyasal olarak modifiye edilebilir. Örneğin, fosfatidiletanolamin (PE) genellikle amin grubu

aracılığıyla polietilen glikol ile konjuge edilir. Ana grubun yükü, yüklü lipozomlar elektrostatik olarak birbirini ittiği için stabilite sağlar (Large ve diğ., 2021).

Birçok memeli hücresinin plazma zarında dört ana fosfolipit baskındır: fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) ve sfingomyelin (SM) (Türken, 2012). Gliserofosfolipitler, yani bir gliserol omurgasına sahip lipidler, ökaryotik hücrelerde baskın fosfolipittir (Li ve diğ., 2015).

Lipid bileşimi, açıl zincirinin (RCO-) doyma veya doymamışlık derecesi ile tanımlanabilir. Uzun, doymuş acyl zincirli (yüksek T_m) PC'lerden oluşan lipozomlar, kısa, doymamış acyl zincirli (düşük T_m) PC'lere sahip formülasyonlara kıyasla *in vivo* daha fazla stabilite göstermiştir (Anderson ve Omri, 2004). Lipitlerden oluşan veziküller doğal olarak biyouyumludur ve doğal hücre zarlarını taklit ettikleri için terapötik uygulamalar için idealdir (Large ve diğ., 2021).

Yalnızca PS'in net bir negatif yük, PC, PE ve SM'ler elektriksel olarak nötr, yani bir pozitif ve bir negatif yük taşımaktadır. Bu dört fosfolipit birlikte çoğu zardaki lipit kütesinin yarısından fazlasını oluşturur (Türken, 2012).

SM gibi sfingolipitlerin lipozomal formülasyonlara dahil edilmesi, *in vivo* olarak artan stabilite, daha uzun kan dolaşımı ve artan terapötik etkinlik sergiler (Webb ve diğ., 1995). Seramidler, bir sfingosin ve tek bir yağ asidinden oluşan bir sfingolipit türüdür. Seramidlerin lipozomal formülasyonlara dahil edilmesi, dermal hücrelerle membran akışkanlığını ve füzyon yeteneklerini artırır (Tokudome ve diğ., 2009).

Steroller, neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunan bir doğal lipit molekülleri sınıfıdır. Sterollerin üç alt tipi vardır: sırasıyla bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan fitosteroller, zoosteroller ve mikosteroller (Myant, 1981). Kolesterol endojen bir amfifilik zoosteroldür ve memeli hücre zarlarının kritik bir bileşenidir. Kolesterolün lipozomal formülasyonlara dahil edilmesi, *in vivo* stabilitenin artırır ve lipit çift tabakası boyunca sızıntının azamasını, bu da uzun süreli ve kontrollü ilaç salımını sağlar (Kirby ve diğ., 1980 ; Gregoriadis ve Davis, 1979). Bunun yanı sıra, lipozomal formülasyonlara %20-50 mol kolesterolün dahil edilmesi, kolesterol içermeyen kontrollere göre kapsülleme etkinliğinin azaldığını göstermiştir (Yang ve diğ., 2007).

1.1.3.2 Sentetik lipidler

Sentetik lipidler, ticari olarak sentezlenir ve sıklıkla terapötik lipozomların bileşenleri olarak kullanılır. Bu materyaller endojen olmasa da biyolojik ve yapısal olarak doğal lipidlere benzerler, yüksek biyouyumluluk sergilerler ve yüksek saflıkta sentezlenirler. Yaygın olarak kullanılan sentetik lipidler arasında sırasıyla 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE) ve dioleoil fosfatidilgliserol (DOPG) gibi PC'ler, PE'ler ve fosfatidilgliseroller bulunur. Sentetik lipidler, saflıkları, ticari olarak bulunabilirlikleri, kimyasal işlevleri ve maliyet etkinlikleri nedeniyle genellikle doğal lipidler yerine seçilir. (Large ve diğ., 2021).

1.1.4 Lipozom karakterizasyon yöntemleri

1.1.4.1 Parçacık boyutu

Lipozom bazlı ilaçların genel boyutu, nanotaşıyıcıların klinik başarılarını belirleyen temel bir fiziksel özelliktir (Bozzuto ve Molinari, 2015). Sonikasyon, ekstrüzyon ve homojenizasyon gibi lipozom boyutunun kontrolü için çok sayıda prosedür mevcuttur (Ahmed ve diğ., 2019).

Lipozomların boyut ve boyut dağılımlarını değerlendirmek için çeşitli teknikler mevcuttur. Bunlardan bazıları, dinamik ışık saçılımı (DLS), çeşitli mikroskopi teknikleri (elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu gibi), boyut dışlama kromatografisi (SEC), alan akışı fraksiyonlama ve analitik santrifüjleme yer alır (Edwards ve Beaumner, 2006).

Elektron mikroskopik teknikler sadece lipozomların morfolojilerini ve katmanlı yapılarını incelemek için görselleştirilmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bireysel lipozomların boyutunun doğru tahminini de kolaylaştırır (Egerdie ve Singer, 1982; Larrabee ve diğ., 1978). Bununla birlikte, elektron mikroskobu sistemleri taşınabilir değildir ve teknikler zaman alıcıdır, karmaşık numune hazırlama protokollerini yürütmek için yüksek düzeyde beceri gerektirir ve bu nedenle rutin ölçümler için uygun değildir (Almgren ve diğ., 2000; Egelhaaf ve diğ., 1996). DLS ise, mikron altı aralıkta lipozom popülasyonlarının boyut dağılımının hızlı bir şekilde tahmin edilmesini sağlar. DLS'nin bir sınırlaması, oldukça polidispers lipozom

popölasyonlarının boyut dağılımlarının gővenilir tahminlerini sağlamamasıdır (Filipe ve diğ., 2010).

Lipozom morfolojisi, boyutu ve stabilitesini incelemek için, cam veya mika yőzeve sabitlenmiş bir numune őrzerinde nanometre boyutlu bir prob tarafından hızlı taramaya dayanan atomik kuvvet mikroskobunda (AFM) kullanılmaktadır. 0,1 nm'ye yaklaşan boyutsal özünőrlőėe sahip taramalı prob mikroskopları olan AFM, numune manipölasyonu olmadan bile doğal ortamda kőők lipozomların gőrselleřtirilmesi için benzersiz bir olanak sağlar. (Laouini ve diğ., 2012). AFM analizi hızlı, gőlő ve nispeten non-invaziv bir tekniktir. Depolama sırasında lipozomların olası agregasyon işlemlerinin yanı sıra morfoloji, boyut hakkında bilgi sağlayabilir (Laouini ve diğ., 2012). Bununla birlikte, kırılğan lipozomların şekli, mika yőzeyi ve/veya AFM probu ile etkileşim őrzerine değişebilir (Patil ve Jadhav, 2014).

SEC, lipozom popölasyonlarını hidrodinamik boyutları temelinde çözerek parçalara ayırmak için de kullanılabilir (Grabielle-Madelmont ve diğ., 2003). Bununla birlikte, kolon malzemesi için lipitlerin daha yőksek afinitesinin lipozomların yırtılmasına yol açabileceği ve dolayısıyla SEC ölőmlerini tehlikeye atabileceği bildirilmiştir (Lundahl ve diğ., 1999).

1.1.4.2 Zeta potansiyeli

Sőspansiyon halindeki herhangi bir partiköl tarafından sergilenen fiziksel bir özelliktir. Zeta potansiyeli ölőmleri, koloidal sistemlerin kararlılığını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılır.

Hidrodinamik kayma sınırındaki (yani kayma dőzlemi) potansiyel olarak tanımlanan zeta potansiyeli, nanopartiköl stabilitesi, dolaşım sőreleri, protein etkileşimleri, partiköl hőcre geçirgenliği ve biyouyumluluk hakkında fikir verebilir (Albanese ve diğ., 2012).

Zeta potansiyeli ölőmleri, ışık saçılımı ilkelerine dayanmaktadır. Kısaca, iki elektrot içeren bir odaya bir numune yerleştirilir ve yőklő nanopartikőllerin zeta potansiyeline orantılı bir hızla karşılığ gelen elektrota gő etmesine neden olan bir elektrik alanı uygulanır. Faz analizi ışık saçılımı (PALS) kullanılarak, parçacık hızı

saçılan ışığın faz kaymasından ölçülür (Smith ve diğ., 2017). Zeta potansiyeli ölçümlerinde, numune boyunca bir elektrik alanı uygulanır ve nanopartiküllerin hareketi (elektroforetik hareketlilik) lazer doppler hız ölçümü (LDV) ile ölçülür (Clogston ve Patri, 2011).

Zeta potansiyelleri > 30 mV veya < -30 mV olan partikül süspansiyonları kararlı kabul edilir (Hunter ve diğ., 2001).

1.1.4.3 Enkapsülasyon verimliliği

Lipozom süspansiyonları, kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş etken maddelerin karışımından meydana gelir. Enkapsülasyon etkinliği (EE), formülasyon sırasında lipozoma dahil edilen ilaç miktarının bir ölçüsüdür. Toplam ilaçtan serbest dahil edilmemiş ilacın çıkarılması ve başlangıçta eklenen toplam ilaca bölünmesiyle tanımlanır (Large ve diğ., 2021). EE'nin artırılması, ilaç biyoyararlanımının artırılmasına katkıda bulunacaktır.

Maddenin kimyasına bağlı olarak farklı yöntemler kullanılarak EE belirlenebilir. EE'yi ölçmek için en doğrudan yöntem, lipozom süspansiyonlarının ayrılmasından ve veziküllerden ayrılan süpernatantın içeriğinin hesaplanmasıdır. Serbest içerik ile kapsüllenmiş içerik arasındaki ayrım, ultrasantrifüj ve diyaliz membranı gibi ayırma teknikleriyle sağlanabilir. Ultrasantrifüjleme tekniği, ilaç yüklü lipozomların ortamdaki ayrılması için basit ve hızlı bir yöntem olarak bildirilmiştir (Laouini ve diğ., 2012).

Ayrıca, lipit çift tabakasının metanol, kloroform veya Triton X-100 tarafından çözülmesi veya parçalanması, ardından filtrasyon ve ölçüm ile elde edilen enkapsüle olan madde miktarı doğrudan belirlenebilir. Bu ölçüm için kullanılan teknikler, kapsülleyicinin doğasına bağlıdır ve ultraviyole-görünür (UV-Vis) spektrofotometre, floresan spektroskopisi, enzim bazlı yöntemler ve elektrokimyasal teknikleri içerir (Laouini ve diğ., 2012 ; Trucillo ve diğ., 2020).

1.1.4.4 Lamellarite

Lipid çift tabakalı lipozomların sayısı, kapsülleme etkinliğini ve ilaçların salma kinetiğini etkiler. Ayrıca, lipozomlar hücreye alındığında veya hücrede işlendiğinde,

hücre içi kader katmanlı yapıdan etkilenir. Farklı lipitlerden veya hazırlama prosedürlerinden yapılan lipozomların katmanlı yapısı büyük ölçüde değişir. Bu nedenle, lipozomların katmanlı yapısının analizi dikkate alınması gereken önemli bir parametredir (Laouini ve diğ., 2012). Lipozom katmanlılığı, genellikle, reaktiflerin eklenmesi üzerine lipit işaretleyicisinin görünür veya flüoresan sinyal değişikliğine dayanan yöntemlerle gerçekleştirilir.

Lipozom katmanlılığının (lamellarite) tahmini genellikle, katmanlılık derecesinin Mn^{2+} ilavesinden önceki ve sonraki sinyal oranından belirlendiği (Mayer ve diğ., 1986) ^{31}P NMR (Frohlich ve diğ., 2001) ile gerçekleştirilir. Sıklıkla kullanılmasına rağmen, bu tekniğin Mn^{2+} konsantrasyonuna, lipozom tipine ve tampon konsantrasyonuna oldukça duyarlı olduğu bulunmuştur (Frohlich ve diğ., 2001). Tabakalılık belirlemeye yönelik diğer teknikler, küçük açılı X-ışını saçılımını (SAXS) (Jousma ve diğ., 1987; Skalko ve diğ., 1998) ve elektron mikroskobu (Hauser, 1984; Hope ve diğ., 1986) içerir.

1.2 Makroalglerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Makroalgler denizlerde ve okyanuslarda yaşayan fotosentetik organizmalardır. Çeşitli faydaları olduğu bilinmektedir ve birçok önemli biyoaktif bileşiğin kaynağı olarak kabul edilmektedir.

Genel anlamda algler, tek hücreli mikroalglerden çok hücreli makroalgelere kadar çok çeşitli formlara sahip fotosentetik organizmalardır (Çakir Arica ve diğ., 2017). Fitoplankton gibi mikroalg türleri su sütununda asılı halde hayatta kalırken, makroalgler (genellikle deniz yosunu olarak anılır), birkaç santimetre ila birkaç metre arasında değişen bitki benzeri organizmalardır (Hernández Fariñas ve diğ., 2017).

Makroalgler, deniz seviyesinden ışığın ulaştığı en derin bölgelere kadar yayılış gösterebilirler. Taşıdıkları çeşitli yardımcı pigment maddeleri sayesinde fotosentez verimliliklerini artırmışlardır (Fawcett ve diğ., 2017). Makroalgler genel olarak sahip oldukları pigment maddelerine göre 3 grupta incelenmektedir; Phaeophyceae (kahverengi algler), Chlorophyceae (yeşil algler) ve Rhodophyceae (kırmızı algler) (Rashad ve El-Chagbaba, 2020).

Rhodophyceae'nin kırmızı rengi, klorofil a, β -karoten ve diğer ksantofiller gibi diğer pigmentleri maskeleyen fikoeritrin ve fikosiyanin gibi pigmentlerin baskınlığından kaynaklanır (Rashad ve El-Chagbaby, 2020).

Chlorophyceae'nin yeşil rengi, β -karoten ve çeşitli karakteristik ksantofiller gibi yardımcı pigmentleri maskeleyen klorofil a ve b'den gelir (Lewis ve McCourt, 2004).

Phaeophyceae'nin kahverengi rengi, diğer pigmentleri, örneğin klorofil a ve c, β -karoten, ksantofilleri maskeleyen, ksantofil pigment baskınlığının fukoksantin ürünüdür (Rashad ve El-Chagbaby, 2020).

İnsan veya hayvan beslenmesi, ilaç, kozmetik veya biyoenerji gibi çeşitli alanlardaki uygulamaları için yeni deniz bileşikleri üzerine araştırmalar son yıllarda artmıştır. Alg türlerinde bu çeşitliliğin olması, içinde yaşadıkları ve yaşamlarını sürdürdükleri yaşam ortamlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Su ortamları değişken sistemlerdir, hayatta kalabilmek için diğer organizmalarda bulunamayan çok çeşitli ikincil metabolitler üreterek yeni çevre koşullarına hızla uyum sağlamaları gerekir. Deniz organizmaları, karasal türlerden büyük ölçüde farklı bir ekosistemde bulunduğundan, ikincil metabolitlerinin önemli ölçüde değiştiği sonucuna varmak doğru olur (Morsy ve diğ., 2020). Zengin potansiyele sahip alglerin çok işlevli terapötik önemi ile ilgili bilimsel çalışmalar son yıllarda artmaktadır (Pal ve diğ., 2014).

Denizlerin en önemli canlı kaynaklarından biri olan alglerden gıda, tarım, kozmetik, tıp, eczacılık ve endüstri dallarında yararlanılmaktadır (Aktar ve Cebe, 2010). Algler, özellikle yeni farmasötik ajanların geliştirilmesinde önem taşıyan yüksek biyoaktif sekonder metabolitlere sahiptirler (Cirik ve Cirik, 2011 ; Gümüş, 2006).

Başta antimikrobiyal ve sitotoksik biyoaktivitelere sahip olan bu metabolitlere örnek olarak alkaloidler, poliketidler, siklik peptitler, polisakkaritler, florotanninler, diterpenoidler, steroller, kinonlar, gliserol-lipidler verilebilir. Algler, ilaç endüstrisine ilaç üretiminde yeni bir biyoaktif bileşik kaynağı sağlar (Hamed ve diğ., 2018). Alglerin çoğu, bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriyel patojenlerin büyümesini engelleyen biyoaktif bileşenlere sahiptir. Makroalglerin kimyası üzerine yapılan araştırmalar, son yıllarda, potansiyel farmasötik uygulamalar için biyoaktivitelere

veya diğ er potansiyel ekonomik özelliklere sahip bileşiklere duyulan ihtiyaç nedeniyle artmıştır.

Son yıllarda, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antineoplastik, antifouling, antiinflamatuvar, antit m rik, sitotoksik ve antimitotik aktiviteler gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip makroalg türevli bileşikler hakkında çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

1.2.1 *Ulva lactuca* ve genel  zellikleri

Ulva lactuca bir makroalgdir ve 17. yüzyılda Baltık Denizi'nde Linnaeus tarafından tanımlanan Chlorophyta filumuna aittir (Wichard ve diğ., 2015). *U. lactuca*, özellikle Akdeniz kıyılarında geniş bir dağılıma sahip olan ve halk arasında deniz marulu olarak bilinen bir tür yeşil makroalgdir (Allouche, 2021).



şekil 1.4 : *Ulva lactuca* türünün morfolojisi

U. lactuca esasen genellikle kayalık kıyılarda bulunan ve taşlara, kayalara vb. yapışık halde bulunan bir deniz yosunudur. Hafıf sarımsı ile siyahımsı yeşil arasında düzensiz, ancak yuvarlak fırfırlı kenar şekilli yarı saydam yumuşak yapraklara sahiptir ve yapraklar tutucu yardımıyla kayalara bağılanır (Yu-Qing ve diğ., 2016). Oldukça küçük olan 20-30 cm çap kazanır (Braune ve Guiry, 2011; Pereira ve diğ., 2010). Morfolojisinde belirgin mevsimsel değişimler görülebilir, genç bitkiler koyu yeşil renklidir ve dokunulduğunda yumuşaktır, oysa daha yaşlı thalli açık yeşil olur ve yüzeyleri kayganlaşır (Baweja ve diğ., 2016).

Hücre duvarları, hastalık kontrolü de dahil olmak üzere çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip, ekonomik açıdan önemli bir bileşik olan "ulvan" içerir (Jaulneau

ve diğ., 2010). *U. lactuca*, %54,0 lif, %19,6 mineral, %8.5 protein, %20,6 hemiselüloz %9 selüloz ve %1.7 lignin ile %7,9 lipid içerir (Yaich ve diğ., 2011).

U. lactuca, kozmetik, farmasötik, kimyasal, gıda ve enerji uygulamalarında kullanılabilen ticari olarak değerli kimyasal bileşikler içerir. *U. lactuca*'nın %60'a kadar karbonhidrat, %10-47 protein, %1-3 lipid ve %7-38 mineral kül içerdiği bildirilmiştir (Dominguez ve Loret, 2019). *U. lactuca* türünde bulunan büyük endüstriyel öneme sahip biyoaktif bileşikler fenolikler, pigmentler (klorofiller ve karotenoidler) ve polisakkaritlerdir (Caf ve diğ., 2015).

U. lactuca, alkaloid, flavonoid, tanen, steroid, saponin ve antrakınon gibi antibakteriyal potansiyele sahip biyoaktif bileşikler içermektedir (Umapoorani ve diğ., 2016; Godeh ve diğ., 2017). *U. lactuca* türünün antioksidan kapasitesi, içeriğinde bulunan fenolik, terpenoid, sülfatlanmış polisakkarit lakton, sterol ve yağ asitlerinden gelmektedir. Bu bileşiklerin antioksidan aktivitesi temel olarak süperoksit ve hidroksil radikallerine karşı temizleme aktivitesine, şelatlama kabiliyetine, tekli ve üçlü oksijeni söndürme ve azaltma gücüne bağlanmaktadır (El-Baky ve diğ., 2008; Alghazeer ve diğ., 2013).

1.2.1.1 *Ulva lactuca* türünün antioksidan etkinliği

Antioksidanlar insanda oksidatif strese bağlı hastalıkların düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Yeşil algler geniş bir güçlü antioksidan aktivite spektrumuna sahip oldukları bilinmektedir.

Antioksidan aktivite, deniz biyoaktif maddelerinde en önemli aktiflerden biridir ve birçok alg ve alg türevi bileşik, karotenoidler, fenolikler, terpenoidler ve sülfatlı polisakkaritler gibi güçlü antioksidanlar sergiler (El-Baky ve diğ., 2008). Bu bileşiklerin antioksidan aktivitesi esas olarak süperoksit ve hidroksil radikallerine karşı süpürme aktivitesine, şelatlama kabiliyetine, singlet ve triplet oksijeni söndürmeye ve indirgeme gücüne atfedilir (Ruberto ve diğ., 2001; Athukorala ve diğ., 2006).

Diğer yeşil algler gibi, *U. lactuca* türü de antioksidanlardan ve temel minerallerden amino asitlerin ve yağ asitlerinin yüksek düzeyde anlamlı ve eksiksiz profillerine

kadar birçok temel biyoaktif fraksiyonun zengin bir kaynağıdır (Yu-Qing ve diğ., 2016).

Khairy ve El-Sheikh (2015), *U. lactuca* türünün antioksidan aktivitesi üzerindeki mevsimsel etkiyi bildirmiştir. Antioksidan potansiyelini tahmin etmek için β -karoten, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve toplam fenolik içerikler dikkate alınmıştır. *U. lactuca* ekstresi 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %33 'lük maksimum serbest radikal süpürme aktivitesi ile yaz mevsiminde sergilemiştir. Yine yaz mevsiminde *U. lactuca* türünün en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmalar, *U. lactuca* türünün güçlü bir potansiyel antioksidan madde olarak öne çıktığını göstermektedir.

Boisvert ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, *U. lactuca* etanol ekstresinin antioksidan kapasitesini DPPH radikal süpürme aktivitesi, FRAP ve ORAC deneylerini kullanarak belirlemiştir. Total fenolik içeriğini (TPC) Folin–Ciocalteu metoduyla saptanmıştır. TPC $6,9 \pm 0,01$ mg GAE/g olarak bulunmuştur. Ekstrenin 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda DPPH, FRAP ve ORAC sonuçları sırasıyla; $\%52,0 \pm 0,6$, $360,8 \pm 0,01$ $\mu\text{mol TE/g DW}$ ve $347,7 \pm 33,58$ $\mu\text{mol TE/g DW}$ olarak bulunmuştur.

Alagan ve diğ. (2017) *U. lactuca* türünün metanol ekstresinde Folin–Ciocalteu metoduyla TPC ve DPPH yöntemiyle radikal süpürme aktivitesini araştırmışlardır. Sonuçlara göre 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda TPC *U. lactuca* için 0,881 mg/g ve gallik asit için 1,418 mg/g olarak hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri ise *U. lactuca* için 81,36 $\mu\text{g/mL}$ iken askorbik asit için 59,65 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Farvin ve diğ. (2019), 26 farklı alg türünün absolute etanol, etanol:su(50:50) ve su ekstrelerinin kimyasal profilini ve antioksidan etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada *U. lactuca* türünün TPC ve DPPH radikal süpürme aktivitesine bakılmıştır. Absolute etanol, etanol:su (50:50) ve su ekstrelerinin TPC değerleri sırasıyla $8,0 \pm 2,0$, $6,6 \pm 1,5$ ve $4,4 \pm 0,9$ mg GAE/g olarak hesaplanmıştır. Absolute etanol, etanol:su (50:50) ve su ekstrelerinin $1/\text{IC}_{50}$ değerleri sırasıyla $0,4 \pm 0,01$, $0,7 \pm 0,01$ ve $1,0 \pm 0,02$ mg/mL olduğu belirtilmiştir.

1.2.1.2 *Ulva lactuca* türünün antibakteriyel etkinliği

Patojenik mikroplar her yerde bulunur ve insan sağlığı sorunu sorunlarının ana nedenidir. Tıpta çeşitli önleyici ve iyileştirici müdahaleler benimsenmiştir. Sentetik ve doğal ilaçların geliştirilmesi, insan sağlığı sorunlarını tedavi etmenin kritik yollarından biridir. Zaman geçtikçe en az yan etkiye sahip olduğu düşünölen doğal ilaçlara olan ilgi artmaktadır. Benzer şekilde, *U. lactuca* insan patojenik mikroorganizmalarını kontrol etmede güçlü bir kaynak olarak değerlendirilmiştir.

Abdel-Khaliq ve diğ. (2014), *U. lactuca* türünün etanolik (%70) ekstresinin antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. *U. lactuca* türünün etanolik ekstresinin gram pozitif bakteriler *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı yüksek aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Ekstre ayrıca gram negatif bakteri *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* ve *Neisseria meningitides* bakterilerine karşı önemli bir inhibisyon sergiledi. *S. aureus* bakterisine karşı $22,0 \pm 0,8$ mm, *E. coli* bakterisine karşı $20,2 \pm 0,2$ inhibisyon zonu sergilediği bildirilmiştir.

Tüney ve diğ. (2006) taze ve kurutulmuş *Ulva spp.* türlerinin methanol, acetone, diethyl ether, and ethanol ekstrelerinin *Candida sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesini agar difüzyon yöntemiyle test etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda *Ulva rigida* taze alginin, dietil eter ekstresinin *E. coli* için 22,5 mm, *S. aureus* için 38 mm inhibisyon çapı verdiği belirtilmiştir. Ayrıca taze alg ekstrelerinin, kurutulmuş alg ekstrelerine kıyasla mevcut çalışmanın patojenlere karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Priya ve Poonguzhali (2015)'nin yaptığı çalışmada, *U. lactuca* türünün etanolik, petrol eteri ve amonyak çözeltisi ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesini dört patojenik bakteriye (*E. coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus* ve *S. pyogenes*) karşı kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. *E. coli* büyümesinin en yüksek inhibisyonu etanolik ekstre tarafından sağlandığı bildirilmiştir.

El-Baky ve diğ. (2009), *U. lactuca* türündeki karotenoidleri, fenolikleri ve toplam klorofil içeriğini ölçmüştür. Ekstreler, minimum inhibisyon konsantrasyonların

(MİK) 0,35-0,40 mg/mL arasında değiştiği altı bakteri için antibakteriyel aktivite açısından test edilmiştir.

Boisvert ve diğ. (2015), gıda bozulma bakteri suşları *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9342 ve *B. thermosphacta* ATCC 11509 bakterilerine karşı *U. lactuca* türünün etanolik ekstresinin farklı konsantrasyonlarının antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Ekstrenin MİK değeri, optimize edilmiş kritik mikro seyreltme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *U. lactuca* ekstresinin, 500 µg/mL konsantrasyonunda *E. coli* (%69,5) ve *M. luteus* (%61,4) için en yüksek büyüme inhibisyonunu göstermiştir.

Alagan ve diğ. (2017), üç gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diptheriae* ve *Staphylococcus aureus*), üç gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella paratyphi*) ve üç mantar izolat (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans*)'a karşı disk difüzyon tekniğini *U. lactuca* metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Ekstrenin, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı inhibisyon çapı sırasıyla 10 ve 13 mm ve MİK değerleri *S. aureus* için 250 µg/mL ve *E. coli* için 500 µg/mL olarak bulunmuştur.

Kandhasamy ve Arunachalam (2008)'ın yaptığı çalışmada, *U. lactuca* türünün metanol ekstresinin patojen mikroorganizmalara (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aereus* ve *Bacillus subtilis*) karşı *in vitro* antibakteriyel potansiyelini agar difüzyon yöntemiyle test etmiştir. *U. lactuca* metanol ekstresinin, 17±0,38 mm inhibisyon çapıyla *S.aureus* bakterisine karşı en etkili olduğu bildirilmiştir. *E. coli* bakterisine karşı ise hiç etkisi olmadığı belirtilmiştir.

Alghazeer ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada, Libya kıyılarından elde edilen *U. lactuca* türünden elde edilen sulu ve metanolik ekstraktların antibakteriyel aktivitesini değerlendirmiştir. Ekstrenin antibakteriyel potansiyeli, gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus spp.*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhi*) dahil olmak üzere 8 patojenik bakteriye karşı test edilmiştir. *U. lactuca* ekstresinin test edilen tüm bakterilere karşı 11 ila 14 mm aralığında

inhibisyon çapı verdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, bazı durumlarda bu patojenik bakterilere karşı metanolik ekstrenin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

1.3 Antioksidan Etkinliği Belirlemede Kullanılan Metotlar

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonuna dayananlar ve tek elektron transferi (ET) reaksiyonlarına dayananlar temel olarak iki sınıfta toplanabilir. HAT mekanizmasına dayanan tayinlerin çoğu yarışmalı reaksiyon kinetiğini izler ve kantitasyon kinetik eğrilerinden yapılır. HAT esaslı yöntemlerde sistem, sentetik bir radikal üretici, yükseltgenebilir moleküler bir prop ve antioksidan bir bileşikten meydana gelir. ET'ye dayanan metotlar ise reaksiyon sonundaki indikatörü olarak bir antioksidan ve redoks reaksiyonunu barındırır (Ardağ, 2008).

Birçok örnekte çok çeşitli antioksidan moleküllerin bulunduğu göz önüne alındığında antioksidan kapasite belirlenirken tek bir yöntem yerine çeşitli yöntemler uygulanarak karar vermek daha uygun olabilir.

1.3.1 HAT esaslı analiz yöntemleri

HAT tabanlı deneyler, bir antioksidanın serbest radikalleri (genellikle peroksil radikalleri) H-atomu bağıışı ile söndürme kabiliyetini ölçer (Gupta, 2015).

1.3.1.1 β -karoten veya crocin-bleaching testi

Karotenoidler, ışık veya ısı veya peroksil radikalleri (örneğin, AAPH veya oksitleyici lipidler) tarafından indüklenen otoksidasyon yoluyla ağartılır. Antioksidan içeren bir örneğin, bireysel antioksidanların veya bitki özlerinin eklenmesi, β -karoten ağartmasının inhibisyonuna neden olur (Laguerre ve diğ., 2007). Test, antioksidanlar tarafından sağlanan β -karoten veya krosin bozunma oranındaki azalmayı ölçer. Fosfat tamponunda (pH 7.0) 443 nm'de optik olarak renk kaybı izlendi, bu nedenle özel bir enstrümantasyon gerekmez. Ağartma hızı, AAPH eklendikten ~1 dakika sonra doğrusal hale gelir ve 10 dakika süreyle izlenir (Huang ve diğ., 2005).

1.3.1.2 Oksijen radikal absorbands kapasitesi (ORAC)

Antioksidan kapasiteyi belirlemeye yönelik standartlaştırılmış yöntemlerden biri ORAC tahlilidir. ORAC yöntemi ilk kez Cao, Alessio ve Cutler tarafından önerilmiştir (Cao ve diğ., 1993).

AAPH (2, 2'-azobis-2-metil-propanimidamit, dihidroklorür) gibi azo bileşiklerinin termal ayrışmasıyla başlatılan peroksil radikalının indüklediği oksidasyonun inhibisyonuna dayanır.

Test, bir azit başlatıcı AAPH'nin 37°C'de parçalanmasıyla peroksil-radikal oluşumuna bağlı olarak zaman içinde floresan kaybını ölçer (Glazer, 1990). Floresandaki azalma optik olarak takip edilir ve antioksidan aktivite, antioksidan varlığında floresan kaybının yavaşlaması ile belirlenir. Suda çözünür bir E vitamini analogu olan Troloks (6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), doza bağlı bir şekilde floresan bozulmasını önleyen bir pozitif kontrol görevi görür. Peroksil radikali, floresansız bir ürün oluşturmak için floresanı (3', 6'-dihidroksi-spiro [izobenzofuran-1[3H], 9' [9H]-ksanten]-3-one) oksitleyebilir. Antioksidanlar, floresan sinyalinin oksidatif bozulmasını önleyerek bir hidrojen atomu transfer mekanizması ile bu reaksiyonu bastırır. Floresans sinyali, 485 nm'de eksitasyon, 538 nm'de emisyon ve 530 nm'de kesme ile 30 dakikada ölçülür. Test numunesindeki antioksidan konsantrasyonu, tahlil boyunca floresans yoğunluğu ile orantılıdır ve eğrinin altındaki net alan bilinen bir antioksidan olan trolox 27 ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Antioksidanlar, hidrojen atomu transferi ile floresanın oksidasyonunu inhibe eder. Orijinal ORAC tahlili, daha sonra tutarsızlığı, ışığa duyarlılığı ve polifenollerin bağlanmasıyla ilgili sorunları nedeniyle floresan ile değiştirilen radikal hedef olarak floresan proteini β -fikoeritrin kullanılarak geliştirilmiştir (Gupta, 2015).

ORAC testinde bir antioksidanın koruyucu etkisi, körünkine (AUC_{sample} – AUC_{blank}) kıyasla numunenin floresan bozunma eğrisi altındaki net entegre alanla ölçülür ve tek bir değerde gecikme süresi, başlangıç hızı ve toplam inhibisyon anlamına gelir (Prior ve diğ., 2005). Antioksidan kapasitenin hafife alınmasını önlemek ve ikincil antioksidan ürünlerin potansiyel etkilerini hesaba katmak için ORAC testi reaksiyonu uzun süreler boyunca takip eder, örneğin ≥ 30 dakika AUC yaklaşımının avantajı, hem farklı gecikme fazları sergileyen hem de gecikme fazı

olmayan antioksidanlar için eşit derecede iyi çalışmasıdır. Genellikle birden çok bileşen içeren ve karmaşık reaksiyon kinetiğine sahip numuneler için özellikle yararlıdır. FL probu ucuzdur ve tam otomatik bir mikropilaka floresan okuyucunun kullanılması, yöntemi kolayca erişilebilir hale getirir ve numune veriminde en az on kat artışla tahlilin etkinliği artar (Huang ve diğ., 2002). ORAC testinin diğer bir avantajı, farklı serbest radikal oluşturmaları veya oksidanları kullanma yeteneğidir.

1.3.1.3 Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)

Bu yöntem, floresan probu olarak R-fikoeritrin (R-PE) kullanır. R-PE'nin AAPH ile reaksiyon ilerlemesi florometrik olarak izlenir ($\lambda_{ex}=495$ nm ve $\lambda_{em}=575$ nm). R-PE şimdiye kadar tanımlanmış en parlak floresan boyadır ve orijinal olarak kırmızı alg *Gracilaria*'dan izole edilmiştir. TRAP değerleri, Trolox ile karşılaştırıldığında antioksidanın neden olduğu gecikme fazının uzunluğundan hesaplanır. Luminol, kemilüminesan madde 28 olarak da kullanılabilir (Gupta, 2015).

1.3.2 ET esaslı analiz yöntemleri

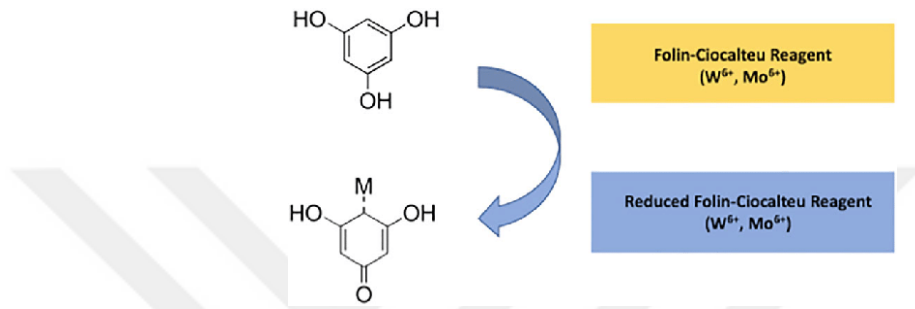
ET'ye dayalı metotlar, indirgendiğinde renk değişimine uğrayan bir oksidan maddenin örnek içerisindeki antioksidan bileşikler tarafından indirgenmesi ve örneğin indirgeme kapasitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Örnekteki antioksidan içeriğin miktarı ile renk değişiminin miktarı doğru orantılıdır.

1.3.2.1 Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi

Folin-Ciocalteu (FC) kolorimetrisi, Singleton ve Rossi'nin tungsten ve molibden oksitlerin bir karışımı olan reaktifin kimyasal olarak indirgenmesi yönteminin ilk çalışmasına dayanmaktadır. Bu yöntem başlangıçta bir fenolik grup içeren tirozin gibi proteinlerin analizi için tasarlanmıştı (Folin ve Ciocalteu, 1927), ancak daha sonra Singleton ve diğerleri tarafından şaraptaki toplam fenolik içeriğin analizi için genişletildi. Bu yöntem hassas, kantitatif ve fenollerin polimerizasyon derecesinden nispeten bağımsızdır, ancak proteinler, nükleik asitler ve askorbik asit için müdahale edici etkileri için düzeltme gerekebilir. Metal oksit indirgeme ürünleri, maksimum 765 nm'de (750-770 nm) geniş bir ışık Emilimi sergileyen mavi bir renge sahiptir. Çoğu fenolik bileşik testin çalışma pH'ında (pH~10) ayrılmış formda

(eşlenik bazlar veya fenolat anyonları olarak) olduğundan, FC reaktifi ile daha kolay oksitlenebilirler (Gupta, 2015).

Kompleks reaktifteki molibden merkezi, mavi bir renk üretmek için bir antioksidan ile donanmış Mo (VI)'dan Mo (V)'ye indirgenir (Şekil 1.5). Bu dalga boyundaki ışık absorpsiyonunun yoğunluğu fenollerin konsantrasyonu ile orantılıdır ve sonuçlar Gallik asit eşdeğerleri (GAE) cinsinden ifade edilir. Fenoller stokiyometrik olarak fosfomolibdik/fosfotungstik asidi azaltır (Singleton ve diğ., 1999).



Şekil 1.5 : Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesini gösteren diyagram (Ford ve diğ., 2019)

Avantajları arasında, FCR'nin tanımlanmamış kimyasal doğasına rağmen, FCR ile yapılan toplam fenol testi uygun, basit ve tekrarlanabilir (Huang ve diğ., 2005). Çeşitli yayınlar, FCR ile toplam fenol tahlilini ve antioksidan kapasite tahlilini (DPPH, FRAP, TEAC, ORAC vb.) uygulamış ve genellikle "toplam fenolik profiller" ile "antioksidan aktivite" arasında mükemmel doğrusal korelasyonlar bulmuştur (Gheldof ve Engeseth, 2002; De Beer ve diğ., 2003; Madhujith ve diğ., 2006; Shahidi ve diğ., 2006; Stratil ve diğ., 2006).

Dezavantajları arasında, metotların standardizasyonunun olmaması vardır. Nihai absorbans değerleri genellikle reaksiyona giren fenolik hidroksil gruplarının sayısı ile orantılıdır ve aynı zamanda molekül yapısına da bağlıdır. Kalibrasyon için kullanılan standart yüksek oranda reaktifse ve yüksek absorbans veriyorsa, numunelerin ölçülen değerleri düşük olacaktır. FCR tabanlı tahlil, toplam fenol tahlili olarak bilinmektedir. FCR reaktifi, birçok fenolik olmayan bileşik tarafından da indirgenebildiği için fenolik bileşiklere özgü değildir (MacDonald-Wicks ve diğ., 2006). FCR ile toplam fenol tahlili, sulu bir faz olan su içinde gerçekleştirilir. Lipofilik antioksidanlar için bu testin mevcut şekli uygulanamaz (Karadağ ve diğ., 2009).

1.3.2.2 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) tayini

TEAC testi ilk olarak Miller ve diğ., (1993) ve geliştirilmiş ve gıda numunelerinde antioksidan kapasitenin test edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ABTS, H_2O_2 varlığında peroksil radikalleri veya diğer oksidanlar tarafından oksitlendiğinde, yoğun bir şekilde renkli olan ve 600-750 nm aralığında spektrofotometrik olarak izlenebilen yarı kararlı bir radikal katyon $ABTS^+$) oluşturan bir peroksidaz substrattır. Antioksidan kapasite, test bileşiklerinin doğrudan $ABTS^+$ radikali ile reaksiyona girerek rengi azaltma yeteneği olarak ölçülür ve Trolox'a göre ifade edilir (Roginsky ve Lissi 2005). TEAC tahlili genellikle antioksidanları sıralamak ve yapı aktivite ilişkilerinin inşası için kullanılır (Arts ve diğ., 2004). TEAC değeri ile bir antioksidanın verebileceği elektron sayısı arasında bir ilişki yoktur (MacDonald-Wicks ve diğ., 2006).

1.3.2.3 Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü

FRAP testi, fenoliklerin elektron veren antioksidanların etkisiyle sarı ferrik tripiridiltiazin kompleksini ($Fe(III)$ -TPTZ) mavi demirli komplekse ($Fe(II)$ -TPTZ) indirgeme kabiliyetine dayanır (Benzie ve diğ., 1999). 593 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülen sonuçtaki mavi renk, elektron veren antioksidanların toplam indirgeme kapasitesi ile doğrusal olarak ilişkili olarak alınır. Temel olarak, TEAC testi ile FRAP testi arasında çok fazla fark yoktur, ancak TEAC nötr pH'ta yapılırken, FRAP testi demir çözünürlüğünü korumak için asidik (fizyolojik olmayan düşük pH değeri = 3.6) koşullar gerektirir. Bir FRAP birimi, 1 mol $Fe(III)$ 'ün $Fe(II)$ 'ye indirgenmesi olarak tanımlanır (Huang ve diğ., 2005).

1.3.2.4 DPPH radikal süpürme aktivite tayini

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali, uzun ömürlü bir organik nitrojen radikalidir ve koyu mor bir renge sahiptir. Ticari olarak temin edilebilir ve testten önce üretilmesi gerekmez. Bu tahlilde, mor kromojen radikali, antioksidan/indirgeyici bileşikler tarafından karşılık gelen soluk sarı hidrazine indirgenir (Şekil 1.6). Antioksidanların DPPH'ye karşı indirgeme yeteneği, elektron spin rezonansı ile veya organik ortamda absorbans sabit kalana kadar 515-528 nm'de absorbans düşüşünü izleyerek değerlendirilebilir. Yaygın olarak kullanılan bu

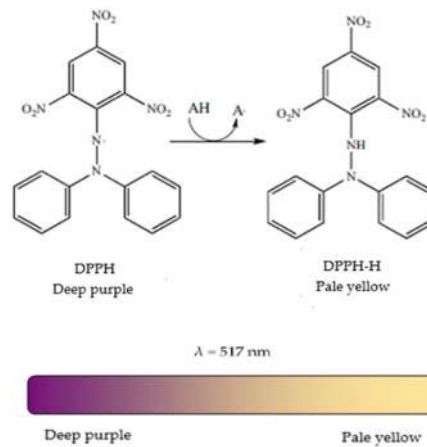
yöntem ilk olarak Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafından bildirilmiştir. Kalan DPPH (%DPPH_{rem}) yüzdesi şu şekilde hesaplanır:

$$\%DPPH_{rem} = 100 \times [DPPH]_{rem} / [DPPH]_{T=0}$$

%DPPH_{rem}, antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır ve başlangıç DPPH konsantrasyonunda %50 azalmaya neden olan konsantrasyon EC₅₀ olarak tanımlanır. EC₅₀ ile sabit duruma ulaşmak için gereken süre T_{EC50} olarak tanımlanır.

T_{EC50} değerlerine göre antioksidanın kinetik davranışı şu şekilde sınıflandırılır: <5 dk (hızlı), 5–30 dk (orta) ve >30 dk (yavaş; SanchezMoreno ve diğ., 1998). Sanchez-Moreno ve diğ., (1998), antioksidan kapasiteyi ifade etmek için ayrıca, T_{EC50}'den daha ayırt edici ve reaksiyon süresini hesaba kattığı için daha kullanışlı olan "antiradikal etkinlik" [AE= (1/EC₅₀) T_{EC50}] olarak adlandırılan başka bir parametreyi tanıttı.

De Beer ve diğerleri (2003) tarafından, süpürülen radikallerin miktarı ve ilk süpürme oranı açısından süpürme aktivitesini birleştiren “radikal süpürme verimliliği (RSE)” olarak tasarlanan benzer ve yeni bir parametre önerilmiştir. RSE, (birinci dakikada elde edilen) ilk temizleme oranı ile EC₅₀ değerinin oranı olarak hesaplanır. Belirlemenin ana sınırlaması, temizlenen radikal yüzdesinin başlangıçtaki DPPH radikal konsantrasyonuna bağlı olmasıdır.



Şekil 1.6 : Bir antioksidan tarafından DPPH temizleme mekanizması (Munteanu ve Apetrei, 2021)

DPPH testi teknik olarak basit ve hızlıdır ve yalnızca antioksidan taramadaki yaygın kullanımını açıklayabilecek bir UV-Vis spektrofotometreye ihtiyaç duyar.

Mikroplakalar kullanılarak çok sayıda örneğin analizi yapılabilir (Fukumoto ve Mazza 2000).

Uygulamasını sınırlayan bazı dezavantajlar vardır. DPPH, sulu ortamda değil, sadece organik ortamda (özellikle alkollü ortamda) çözünebilir, bu da hidrofilik antioksidanların rolünü yorumlarken önemli bir sınırlamadır (Arnao 2000). Fenolik bileşiklerin ve gıda maddelerinin antioksidan durumunu ölçmek ve karşılaştırmak için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, DPPH emilimindeki değişikliklerle antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi, bir antioksidanla reaksiyondan sonra 517 nm'de DPPH radikalinin emilimi ışık (Özçelik ve diğ., 2003), oksijen ve çözücü tipi (Apak ve diğ., 2007) ile azaldığından dikkatli bir şekilde çıkarılmalıdır.). Çözücünün su içeriğinin belirli bir sınırın üzerinde, DPPH'nin bir kısmının pıhtılaşması ve antioksidanlarla kolayca reaksiyona girmemesi nedeniyle antioksidan kapasitesinin düştüğü sonucuna varılmıştır (Magalhaes ve diğ., 2008).

DPPH molekülü, oldukça reaktif ve geçici peroksil radikallerine çok az benzerliğe sahiptir. Ayrıca, in vivo olarak peroksil radikalleri ile hızlı reaksiyona girebilen birçok antioksidan, yavaş reaksiyona girebilir veya hatta DPPH'ye inert olabilir. DPPH ve antioksidanlar arasındaki reaksiyon kinetiği, DPPH konsantrasyonuna doğrusal değildir; bu nedenle EC₅₀ kullanarak antioksidan kapasiteyi ifade etmek sorunludur.

1.3.2.5 CUPRAC (bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi

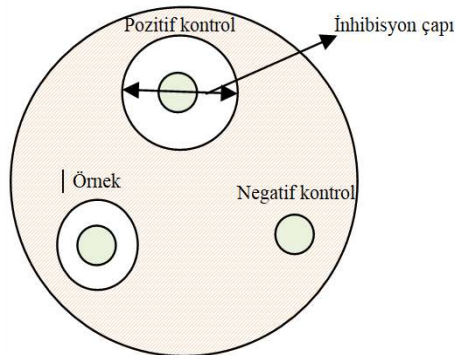
Yöntem, bir numunede bulunan indirgeyiciler (antioksidanlar) tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesine dayanır. Apak ve diğerleri tarafından geliştirilen Bioxytech AOP-490 ve CUPRAC olarak tanıtıldı. (2004). Bioxytech AOP490 testinde, batokuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin), Cu(I) ile 2:1'lik bir kompleks oluşturarak 490 nm'de maksimum absorbanlı bir kromofor üretir. Ürünlerin reaksiyon hızı ve konsantrasyonunu, üretilen Cu(I)'in batokuproin kompleksleşmesi takip eder (Prior ve diğ., 2005). CUPRAC testinde kromojenik oksidan olarak bakır(II)-neokuproin reaktifi kullanılır.

1.4 Antibakteriyel Etkinliği Belirlemede Kullanılan Metotlar

1.4.1 Difüzyon testleri

1.4.1.1 Agar disk difüzyon testi

1940 yılında geliştirilen agar disk difüzyon testi (Heatley, 1944), birçok mikrobiyoloji laboratuvarında rutin antimikrobiyal duyarlılık testi için kullanılan en yaygın yöntemdir. Agar disk difüzyon test prosedüründe, agar plakaları üzerine, test mikroorganizmasının inokulumu yayılır. Ardından, agar yüzeyine istenen konsantrasyonda test bileşici içeren filtre kağıdı diskleri (yaklaşık 6 mm çapında) yerleştirilir. Disk difüzyon deney dizaynı Şekil 1.7'de gösterilmiştir. Petri kutuları uygun koşullarda inkübe edilir. Genel olarak, antimikrobiyal madde agar içine yayılır ve test mikroorganizmasının büyümesini engeller. Ardından inhibisyon büyüme bölgelerinin çapları ölçülür (Balouiri ve diğ., 2016). Antibiyogram, bakterileri duyarlı, orta veya dirençli olarak sınıflandırarak kalitatif sonuçlar sağlar (Jorgensen ve Ferraro, 2009). Bu nedenle, test edilen mikrobiyal suşun direnç fenotipine dayalı bir tiplendirme aracıdır. Ancak bakteri gelişiminin inhibisyonu bakteri ölümü anlamına gelmediği için bu yöntem bakterisidal ve bakteriyostatik etkileri ayırt edemez. Ayrıca, agar ortamına yayılan antimikrobiyal maddenin miktarını ölçmek mümkün olmadığından, agar disk difüzyon yöntemi MİK belirlemek için uygun değildir. Bununla birlikte, disk difüzyon testi diğer yöntemlere göre birçok avantaj sunar: basitlik, düşük maliyet, çok sayıda mikroorganizmayı ve antimikrobiyal ajanı test etme yeteneği ve sağlanan sonuçları yorumlama kolaylığı olarak sıralanabilir (Balouiri ve diğ., 2016).



Şekil 1.7 : Agar disk difüzyon testi

1.4.1.2 Agar kuyusu difüzyon yöntemi

Disk difüzyon yönteminde kullanılan prosedüre benzer şekilde, agar plakası yüzeyi, tüm agar yüzeyi üzerine bir miktar mikrobiyal inokulum yayarak aşılır. Daha sonra, 6 ila 8 mm çapında bir delik, steril bir mantar delici veya uç ile aseptik olarak delinir ve kuyuya bir hacim (20-100 µL) antimikrobiyal madde veya istenen konsantrasyonda ekstre solüsyonu verilir. Daha sonra agar plakaları test edilen mikroorganizmaya göre uygun koşullarda inkübe edilir. Antimikrobiyal madde agar ortamına yayılır ve test edilen mikrobiyal suşun büyümesini engeller (Balouiri ve diğ., 2016).

1.4.1.3 Antimikrobiyal gradyan yöntemi (E test)

E test yöntemi, MİK değerini belirlemek için seyreltme yöntemleri ilkesini difüzyon yöntemleriyle birleştirir. Agar ortamında test edilen antimikrobiyal maddenin bir konsantrasyon gradyanı oluşturma olasılığına dayanır. Etestler (BioMérieux), bu tekniğin ticari bir versiyonudur. Prosedürde, antimikrobiyal ajanın bir uçtan diğer uca artan konsantrasyon gradyanı ile emdirilmiş bir şerit, daha önce test edilen mikroorganizma ile aşlanmış olan agar yüzeyinde biriktirilir. Uygulaması basittir; bu nedenle rutin olarak kullanılır. Ancak, Etest şeritlerinin her biri yaklaşık 2-3 ABD dolarına mal olmaktadır. Bu nedenle, çok sayıda ilaç test edilirse bu yaklaşım maliyetli hale gelir (Jorgensen ve Ferraro, 2009).

1.4.2 Dilüsyon testleri

Dilüsyon yöntemleri, test edilen antimikrobiyal ajanın agar (agar seyreltme) veya broth besiyeri ortamında (makrodilüsyon veya mikrodilüsyon) konsantrasyonunu tahmin etme imkanı sunduklarından, MİK değerlerinin belirlenmesi için en uygun olanlardır. Kaydedilen MİK değeri, test edilen mikroorganizmanın gözle görülür büyümesini engelleyen test edilen antimikrobiyal ajanın en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır ve genellikle µg/mL veya mg/L cinsinden ifade edilir.

MİK değeri belirlendikten sonraki aşamada minimum bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) belirlenmesi gereklidir. MBK, inkübasyondan sonra

inokulumun %99,9'unu öldürmek için gereken en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu olarak tanımlanır.

MBK değerini hesaplayabilmek için dilüsyon yönteminde üreme görülmeyen konsantrasyonlardan alınarak agar besiyerine ekim yapılır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki üremeler kontrol edilir. %99,9 oranında bakterinin öldüğü konsantrasyon MBK değeri olarak ifade edilir.

1.4.2.1 Broth dilüsyon yöntemi

Broth makrodilüsyon yöntemi

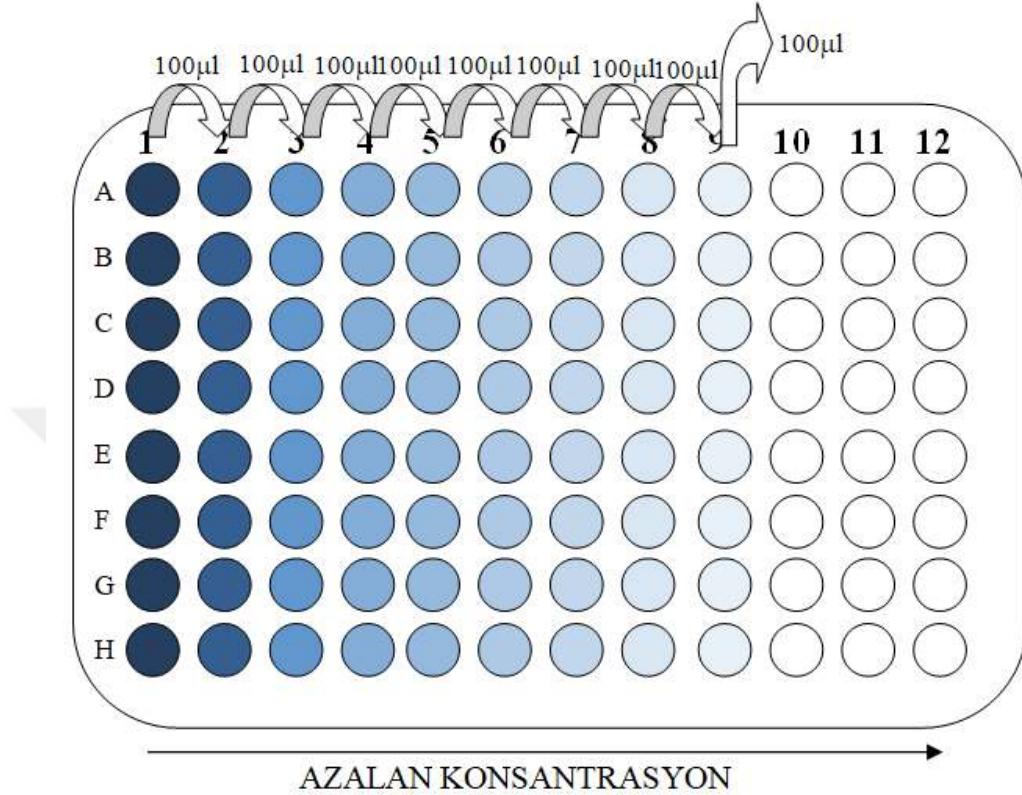
Broth makrodilüsyon yöntemi en eski antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biridir ve sıvı büyüme ortamında antibiyotik ajanların iki kat seri dilüsyonlarını içeren tüpleri kullanır (Jorgensen ve Ferraro, 2009 ; Ericsson ve Sherris, 1971). Daha sonra, her çözeltiye bilinen miktarda bakteri eklenir. Gerekli inkübasyon süresinden sonra, bakteri üremesi, bir MİK değeri veren tüplerdeki bulanıklık ile ölçülür. Broth makrodilüsyon, teşhis amaçlı güvenilir ve standardize edilmiş bir yöntemdir. Büyük bir dezavantaj, her bir antibiyotik solüsyonunun elle hazırlanması gerekmesidir. Bu, ilaç seçiminde ve konsantrasyonunda belirli bir derecede esneklik sağlasa da, özellikle daha büyük deneysel araştırmalar için çok zaman alan bir süreçtir. Tarama için daha uygun olan daha hızlı yöntemler artık sıvı makrodilüsyonun yerini almıştır. Ek olarak, her seyreltme için önemli miktarda reaktif gerekir. Bu nedenle, makrodilüsyonun küçültülmüş bir versiyonu olan mikrodilüsyon geliştirilmiştir (Schumacher ve diğ., 2018).

Broth mikrodilüsyon yöntemi

Broth mikrodilüsyon, en temel antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biridir. Mikrodilüsyon, 96 kuyucuklu bir mikrotiplerde 12 farklı antibiyotik ajanı kullanarak bir test gerçekleştirilerek broth makrodilüsyon verimini artırmaya çalışır.

Prosedür, 96 kuyucuklu mikrotiplerde (mikrodilüsyon) kullanılarak sıvı büyüme ortamında antimikrobiyal ajanın ikişer kat dilüsyonlarının hazırlanmasını içerir (Şekil 1.8). Daha sonra, her bir kuyucuk, 0.5 McFarland ölçeğine ayarlanan standardize edilmiş mikrobiyal süspansiyonun seyreltilmesinden sonra aynı ortamda hazırlanan bir bakteri inokülasyonu ile inoküle edilir. İyi karıştırıldıktan sonra

inoküle edilen 96 kuyucuklu mikrolaka, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında (çoğunlukla çalkalama olmadan) inkübe edilir (Balouiri ve diğ., 2016).



Şekil 1.8 : Broth mikrodilüsyon yöntemi

En önemli avantajı, çalışma alanı, reaktifler ve süredeki azalmadır. Bununla birlikte, önemli bir dezavantaj, ilaç seçiminin ticari olarak temin edilebilen panellerle sınırlı olmasıdır. Daha yüksek derecede otomasyon ile mikrodilüsyon artık sıvı makrodilüsyona göre tercih edilen altın standart bir tekniktir (Schumacher ve diğ., 2018).

1.4.2.2 Agar dilüsyon yöntemi

Agar seyreltme yöntemi, antimikrobiyal bileşiklerin MİK'lerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Brook ve diğ., 2013; Wiegand ve diğ., 2008). Anaerobik veya aerobik bakteriler, farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal maddelerle desteklenen besleyici agar ortamına ekilir. Koloni oluşturan birimler (CFU) 48 saatlik inkübasyondan sonra sayılır. Bu yöntemin basit ve uygun maliyetli bir okuması vardır ve MİK'leri belirlemede güvenilir olduğu bulunmuştur (Wiegand ve diğ.,

2008). Ancak, CFU oluşumunu sağlamak için kültür süresi uzundur. Agar seyreltme yönteminin avantajları basitliği ve iyi anlaşılmış parametreleridir.

1.5 Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında; *U. lactuca* alg materyalinden elde edilen etanol/su (80/20 ; V/V) ekstresinin, antioksidan kapasitesi ve farklı bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Esasen ekstrenin etkinliğinin yanısıra lipozom ile enkapsülasyonu sonucunda etkinliğinde negatif yönde bir etkisinin olmadığı ve lipozom birleşiminin avantajları belirlenmeye çalışılmıştır.

1.6 Hipotez

Ekstresnin lipozom ile enkapsülasyonu sonucunda, antibakteriyel etkinliği üzerinde pozitif yönde etkisinin olması ve antioksidan etkinliği üzerinde negatif yönde etkisinin olmaması beklenmektedir.

2. MATERYAL METOT

2.1 Materyal

Kimyasal malzemeler: Folin-Ciocalteu (2N, Merck), Gallik asit monohidrat (ISOLAB), Sodyum karbonat (TEKKİM), L-a-Fosfatidilkolin (Soya fasülyesi kaynaklı %30, Sigma-Aldrich), DPBS (7.4 pH, Biowest), Etanol (%99.9, ISOLAB), DPPH (%97, Tokyo Chemical Industry CO. LTD. (TCI)), Metanol (%99.7, ISOLAB), Nutrient Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), Ofloksasin (%0.3 zaridinx biem ilaç), DMSO (%99.9, ISOLAB).

Alg materyali: Çalışmada kullanılan *Ulva lactuca* alg örnekleri 2022 Haziran ayı, Marmara Denizi, Bursa ilinin Mudanya ilçesine bağlı Güzelyalı sahil şeridinden (40.36209 K, 28.91222 D) taze olarak toplanmıştır. Toplanan örneklerden bir tallus alınarak herbaryum kağıdı üzerine yerleştirilip kuru herbaryumu yapılmak üzere saklanmıştır. Ayrıca bir tallus daha alınarak kavanoz içerisine koyularak %37'lik formaldehit çözeltisi ile birlikte yaş herbaryumu yapılmıştır. Örneklerin tür tayini Doç. Dr. İnci TÜNEY KIZILKAYA tarafından tür tayin anahtarı kullanarak gerçekleştirilmiştir.

Toplanan örnekler, Bursa Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik laboratuvarına getirilip epifitlerinden temizlendi. Önce musluk suyu ardından distile su ile yıkandı. Fazla ıslaklıkları alınarak kurutma kağıtları üzerine serilerek kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler daha sonra analizlerde kullanılmak üzere vakumlu paketlerde saklandı.

Ege Denizi'nden örnekler Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. İnci Tüney Kızılkaya'dan temin edilmiştir.

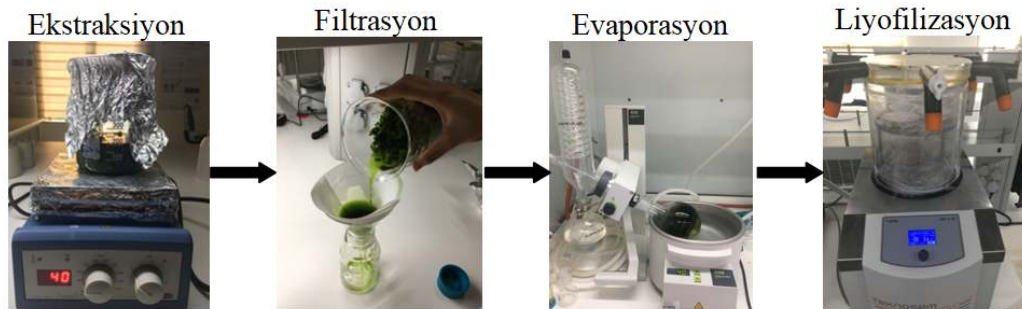


Şekil 2.1 : Alg materyalinin toplanması

2.2 Metot

2.2.1 *U. lactuca* alg örneğinin ekstraksiyonu

Kuru alg örnekleri daha verimli olması açısından öncelikle mekanik olarak öğütülerek küçük parçalara ayrıldı. Örneklerin ekstraksiyonu için çözücü olarak etanol/su (80/20 V/V) karışımı kullanıldı. Ekstraksiyon için kuru örnek:çözücü oranı 1:10 olarak belirlendi. Çözücüyle birleştirilen örnekler ilk 4 saati 40°C sıcaklıklarda olmak üzere toplamda 24 saat boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda ekstraksiyona bırakıldı. 24 saatin sonunda eskre adi filtre kağıdından süzülerek rotary evaporatörde çözücüsü uzaklaşana kadar uçurma işlemi gerçekleştirildi. Balonda kalan ekstre petri kaplarına alınarak -80°C sıcaklıkta dondurularak liyofilizatörde 1 hafta boyunca kurutuldu. Elde edilen kuru ekstre daha sonra analizlerde kullanılmak üzere -20°C' de depolandı.



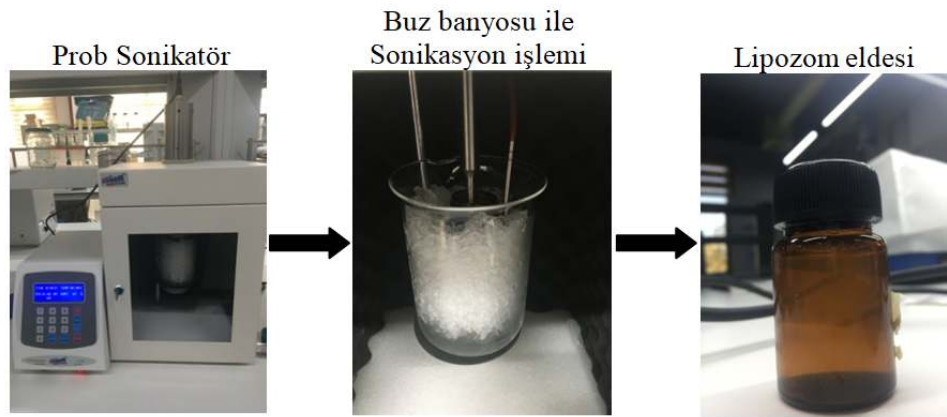
Şekil 2.2 : Liyofilize ekstrenin elde edilme aşamaları

Bir başka ekstraksiyon metodu için, kurutulmuş algler kuru ağırlıklarına göre 20 g olarak tartılmış ve örnek miktarına göre %80'lik etanol eklenerek 2,5 saat boyunca sonik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek evaporatörde etanol çözügeni uçurulmuştur. Bir tek alg örneği için

ekstraksiyonu 3 kez tekrarlanmıştır. Balonda kalan ekstre daha önce darası alınan viallere aktarılarak speed vaccum concentrator cihazında uçurulmuştur. Hızlı Vakum yoğunlaştırıcı cihazı ile uçurulan viallerin içindeki örnek miktarları tartılarak belirlenmiştir.

2.2.2 Lipozom eldesi

Nanolipozomlar prob sonikatör (Optic Ivymen System - CY-500) kullanılarak üretildi. İlk olarak L- α -fosfatidilkolin (S30) materyalinden 5 gr tartılarak 500 mL steril distile suya eklendi. Prob sterilize edilerek, hazırlanan solüsyon içerisine daldırıldı. Sonikasyon esnasında solüsyonun çok ısınmasını önlemek amacıyla örnek buz banyosu içerisinde bekletildi. %60 genlikte 10 dakika boyunca homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenizasyon işlemi yapılırken solüsyona 60 saniye boyunca sonikasyon yapıldı ve 5 saniye duraklatıldı. Bu şekilde solüsyon toplamda 10 dakika boyunca sonike edildi. Sonikasyon sonucunda süt köpüğü renginde lipozom süspansiyonu elde edildi.



Şekil 2.3 : Prob uçlu sonikatör sistemi ve lipozom eldesi

2.2.3 Ekstre yüklü lipozom formülasyonunun hazırlanması

Bu aşamada 0,002 g kurutulmuş ekstre tartılarak 200 µL DMSO ile çözünmesi sağlandı. Hazırlanan ekstre çözeltisinden 100 µL, lipozom solüsyonundan da 100 µL alınarak 1000 rpm hızda 5 saniye tutup 1 saniye bekleterek homojen karışım elde edilene kadar vortex işlemi yapıldı.

2.2.4 Enkapsülasyon verimliliği hesaplama

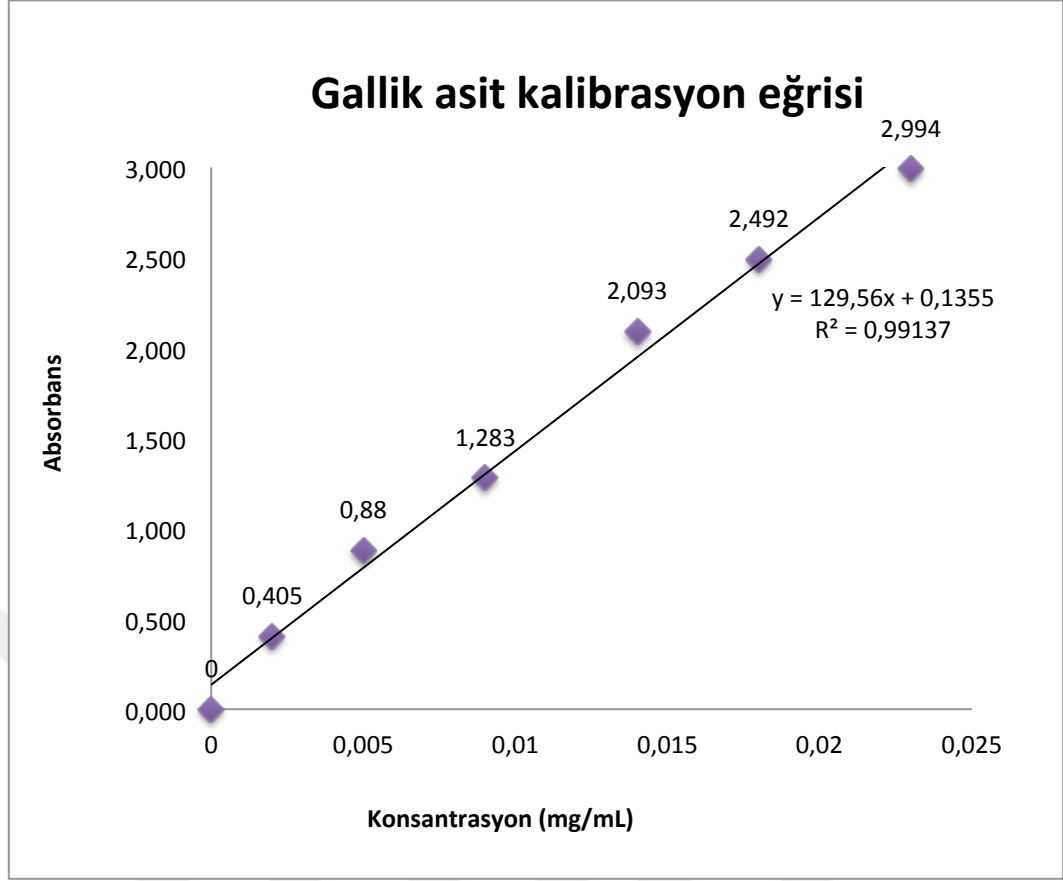
Formülasyonun enkapsülasyon verimliliği hesaplanırken, 0,01 mg/µL konsantrasyonda alg solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan alg solüsyonu ve lipozom 1:1 (V:V) oranında karıştırılarak vortex işlemi yapıldı. Hazırlanan formülasyonda enkapsüle olmayan kısmın 3000 rpm, 4°C'de 1 saat boyunca santrifüjde çöktürülmesi sağlandı. Süpernatant alınarak çökelmiş olan enkapsüle olmayan kısım etüvde 99°C'de kurutuldu. Kurutulduktan sonra kalan kısım tartıldı. Tartımlar üzerinden enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması için Denklem 1 (Baranauskaite ve diğ., 2018)'de belirtilen formüller kullanıldı.

$$\text{Enkapsülasyon Verimliliği}(\%) = \left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \times 100 \quad (1)$$

M_1 = Tartılan alg ekstresinin ağırlığı, M_2 = Kurutulmuş, enkapsüle edilmeyen kısmın ağırlığı

2.2.5 Total fenolik madde (TPC) tayini

Total fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Bu değer gallik asit kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.4) üzerinden elde edilmiştir.



Şekil 2.4 : Gallik asit kalibrasyon eğrisi

Öncelikle gallik asit eğrisi hesaplandı. Eğriyi elde etmek için ise önce %80 etanol içerisinde 125 ppm gallik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm ve 25 ppm konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonların her birinin üzerine, %10 luk 2N Folin-Ciocalteu belirtecinden 2,5 mL eklendi. 10 dk bekleme süresinden sonra her birine %20'lik Na_2CO_3 'den 5'er mL eklendi. Ardından her biri steril ultra saf su ile 10'ar mL'ye tamamlandı. Hazırlanan konsantrasyonlar 2 saat bekletildikten sonra UV-visible spektroskopinde 765 nm'de ölçüm yapıldı. Kör örnek olarak distile su kullanıldı. Elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyonlar ile gallik asit kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen linear denklemi $y = 129.6x + 0.1355$ 'dir.

$$TPC \left(\frac{mgGAE}{g} \right) = \frac{GAE \times V \times DF}{M} \quad (2)$$

GAE (mg/mL): Standart eğri denkleminde çekilen x konsantrasyon değeri, V: Etanol ekstresinin total hacmi, DF: Dilüsyon faktörü, M: Etanol ekstresinin ağırlığı.

U. lactuca Ege ve Marmara alg ekstrelerinden farklı konsantrasyonlarda (100-200-400-800 µg/mL) çözeltiler hazırlandı. Yine hazırlanan farklı konsantrasyonların her birinin üzerine, %10 luk 2N Folin-Ciocalteu belirtecinden 2,5 mL eklendi. 10 dk bekleme süresinden sonra her birine %20'lik Na₂CO₃'den 5'er mL eklendi. Ardından her biri steril ultra saf su ile 10'ar mL'ye tamamlandı. Hazırlanan konsantrasyonlar 2 saat bekletildikten sonra UV-visible spektroskopinde 765 nm'de ölçüm yapıldı. Kör örnek olarak distile su kullanıldı. Ardından galik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ve örneklerin absorbansları Denklem 2'de yerine koyularak TPC değeri belirlendi.

2.2.6 Antioksidan madde kapasite tayini

Antioksidan kapasitesinin tayini için DPPH radikal süpürme aktivitesi metodu uygulanmıştır. DPPH radikal süpürme aktivitesi ekstre ve lipozomal formülasyon için ayrı metotlarla gerçekleştirildi.

2.2.6.1 Ekstrenin DPPH radikal süpürme aktivitesi

Ekstrelerin DPPH tayini için Leelavathi ve Prasad (2014)'ın uyguladığı yöntem esas alındı. Bu yöntemde öncelikle metanol ile 100 µM DPPH solüsyonu taze olarak hemen deney öncesinde hazırlandı. Liyofilize *U. lactuca* alg ekstresinden farklı konsantrasyonlarda (200-400-800 µg/mL) çözeltiler hazırlandı. 0,008 g liyofilize örnek tartılarak 10 mL steril ultra distile su ile çözdürülerek 800 µg/mL stok konsantrasyon elde edildi. Stok solüsyon üzerinden yapılan seyreltmeler ile diğer konsantrasyonlar oluşturuldu. Daha sonra 1 mL alg örneği ile 1 mL DPPH solüsyonu karıştırılarak 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda UV-vis spektrofotometre ile 517 nm'de absorbansları 3 tekrarlı ölçülerek Denklem 3 ile radikal süpürme aktivitesi (%) hesaplandı:

$$\text{Radikal Süpürme Aktivitesi (\%)} = \left[\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

A_{kontrol} = Kontrolün (1 mL DPPH solüsyonu(100µM) + 1 mL Metanol) absorbands değeri ve $A_{\text{örnek}}$ = Alg örneğinin absorbands değeri

Kontrol olarak 1 mL 100 µM DPPH solüsyonu ile 1 mL metanol karışımı kullanıldı. Askorbik asit standart bir antioksidan olarak alg örnekleri ile karşılaştırmak için kullanıldı.

EC_{50} değerleri $Y = a * X + b$ doğru denklemi kullanılarak tahmin edilmiştir (Denklem 4):

$$EC50 = (5 - b)/a \quad (4)$$

a ve b değerleri Excel'de çizilen grafik üzerinden hesaplanan doğru denkleminde alınır.

2.2.6.2 Lipozomal formülasyonun DPPH radikal süpürme aktivitesi

Lipozomal formülasyonun DPPH tayini için Caddeo ve diğ.,(2018)'nin lipozomal formülasyon için yapmış olduğu metot kullanıldı. Bunun için deneyin hemen öncesinde metanol ile 25 µM DPPH solüsyonu taze olarak hazırlandı. Liyofilize ekstrelerden farklı konsantrasyonlar (100-200-400-800 µg/mL) oluşturuldu. Ekstre için 0,008 g liyofilize örnek tartılarak 10 mL steril ultra distile su ile çözündürülerek 800 µg/mL stok konsantrasyon elde edildi ve bu solüsyon üzerinden yapılan seyreltmeler ile diğer konsantrasyonlar oluşturuldu. Ekstre yüklü lipozom için de aynı şekilde 0,008 g liyofilize örnek tartılarak 10 mL lipozom solüsyonu içerisinde vortekslenerek çözündürülerek 800 µg/mL stok konsantrasyonu elde edildi ve bu konsantrasyondan lipozom ile seyreltmeler yapılarak diğer konsantrasyonlar oluşturuldu. 1960 µL DPPH solüsyonu (25 µM) ile 40 µL lipozomal formülasyon karıştırılarak 30 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında UV-vis spektrofotometre ile 517 nm'de absorbandsları 3 tekrarlı okutularak denklem 3'e göre radikal süpürme aktivitesi (%) hesaplandı.

2.2.7 Antibakteriyel testler

2.2.7.1 Kullanılan mikroorganizmalar ve besiyerleri

Antibakteriyel etkinliğin değerlendirilmesi için Gram (+) bakteri modeli olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve Gram (-) bakteri modeli olarak *E. coli* ATCC 25922 Bursa Teknik Üniversitesi arşivinden kullanıldı. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve antibakteriyel testlerin uygulanması için Nutrient Agar (NA) ve Nutrient Broth (NB) besiyerleri kullanıldı.

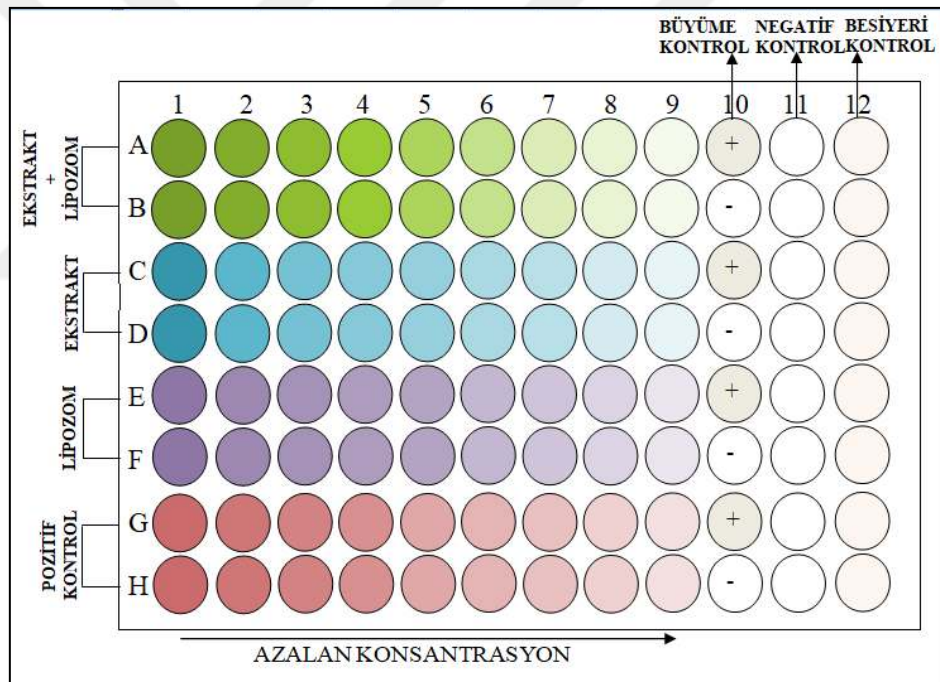
2.2.7.2 Disk difüzyon testi

Disk difüzyon testi Kirby-Bauer (1966) yöntemi esas alınarak gerçekleştirildi. 24 saatlik bakteriler Mcfarland densitometre cihazında (Biosan/Denib) NB besiyeri kullanılarak, 0,5 Mcfarland değerine seyreltildi. Seyreltilen bakteri kültürleri steril eküvyon çubuk kullanılarak NA besiyeri üzerine ekimi yapıldı. Sonrasında petri gerekli alanlara ayrılıp etiketlendirildi. Etiketlendirilmelerine göre blank ve pozitif kontrol (oflaksasin) diski bakteri ekilen petri kaplarına yerleştirildi. Blank disklerden biri negatif kontrol (lipozom) olarak belirlendi. Kalan blank disklerle farklı konsantrasyonlarda ekstreler damlatıldı. Disklere örnekler 10µL hacminde yüklendi. Yüklemler tamamlandıktan sonra petriler parafilm ile sarılarak 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. 24 saatin sonunda test maddelerinin inhibisyon zonları ölçüldü. Disk difüzyon testi her bir bakteri ve test maddesi için 2 tekrarlı yapıldı.

2.2.7.3 MİK ve MBK testleri

MİK, antimikrobiyal ajanının gözle görülür bakteri büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Formülasyonun farklı konsantrasyonları *S.aureus* ATCC 25923’e ve *E.coli* ATCC 25922’ye karşı test edildi. MİK testi için ekstre yüklü lipozom formülasyonu hazırlandı. Formülasyon için öncelikle 4 mg *U. lactuca* ekstresi tartıldı ve 400 µL DMSO ile çözündürüldü. Hazırlanan ekstre solüsyonundan 200 µL çekilerek yine 200 µL lipozom solüsyonu ile vorteksenerek formülasyon hazırlandı. Konsantrasyonların eşitlenmesi için ekstre solüsyonuna da 200 µL steril ultra distile su eklendi. Öncelikle tüm kuyucuklara 100'er µL NB besiyeri eklendi. İlk iki (A ve B) sıranın birinci kuyucuklarına ekstrenin lipozomal formülasyonundan

100'er μL eklenerek pipetaj yapılarak sırasıyla 9. kuyucuğa kadar seyreltildi ve 9. kuyucuktan alınan son 100 μL örnek atıldı. Böylelikle ilk 9 kuyucukta ikişer kat seyrelmiş örnek eklenmiş oldu. Aynı işlem ekstre (C ve D sırası), boş lipozom (E ve F sırası) ve pozitif kontrol (oflaksasin G ve H sırası) için yapıldı. 10. sütundaki kuyucuklar büyüme kontrol, 11. sütundaki kuyucuklar negatif kontrol ve 12. sütundaki kuyucuklar besiyeri kontrol olarak seçildi. Her bir grubun ilk sırasına (A, C, E ve G) 10. kuyucuğa kadar (10. kuyucuk dahil) 10^7 CFU değerindeki bakterilerden 5'er μL eklendi. Kalan kuyucuklara 5'er μL besiyeri eklenerek bütün kuyucukların hacimleri eşitlendi. Deneyin dizaynı Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Büyümenin gözle görülebilir olması için oflaksasin *E. coli* için 2 $\mu\text{g/mL}$, *S. aureus* için 3,9 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna seyreltildi. MİK testi her bakteri ve test madesi için 2 tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 2.5 : MİK deney dizaynı

2.2.8 Örneklerin karakterizasyonunun yapılması

Ekstre, ekstre yüklü lipozom ve boş lipozomun morfolojik karakterizasyonu için zeta potansiyeli ölçümü, boyut ölçümü ve SEM görüntüsü alındı. Zeta potansiyel ölçümü Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, SEM görüntülemesi ise Erciyes Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERFARMA)'nde gerçekleştirildi.

2.2.8.1 Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi

Test maddelerinin ortalama partikül çapı DLS cihazı (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK), zeta potansiyeli ise zeta ölçerle (Zetasizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK) tespit edildi. Her analiz en az 3 kere tekrarlandı.

2.2.8.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntü analizi

Her test maddesinden 10 µL alınarak bakır grid üzerine damlatıldı ve gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu. Ertesi gün kuruyan örneklerin morfolojik karakterizasyonu taramalı transmisyon elektron mikroskobu (ZEISS GEMINI 500 instrument, Germany) ile yapıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Ekstre Yüklü Lipozom Formülasyonunun Enkapsülasyon Verimliliğinin Hesaplanması

Enkapsülasyon verimliliği formülasyonun santrifüjde 3000 rpm'de 4°C sıcaklıkta 1 saat boyunca enkapsüle edilmeyen kısmın çökeltilmesi sağlanarak hesaplandı. Çökeltinin kurutulması ve tartılmasıyla enkapsüle edilmeyen kısım bulundu. Denklem 1 kullanılarak enkapsülasyon verimliliği hesaplandı. Marmara ve Ege ekstrelerinin enkapsülasyon verimliliği sırasıyla %61,63 ve %70,73 olarak hesaplandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 : Ekstrelerin enkapsülasyon verimliliği (%)

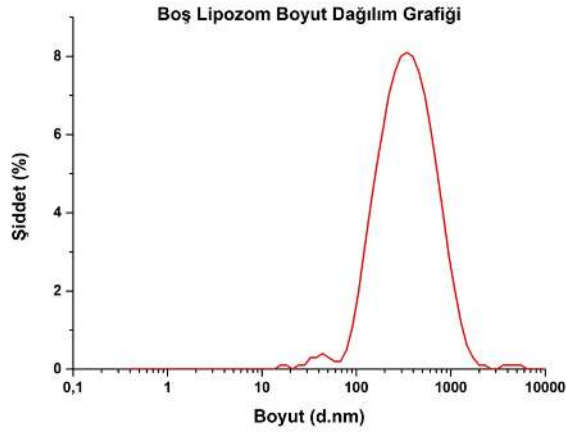
Ekstre	M ₁ (g)	M ₂ (g)	Enkapsülasyon Verimliliği (%)
<i>U. lactuca</i> Marmara	0,0086	0,0033	61,63
<i>U. lactuca</i> Ege	0,0123	0,0036	70,73

3.2 Örneklerin Karakterizasyonunun Yapılması

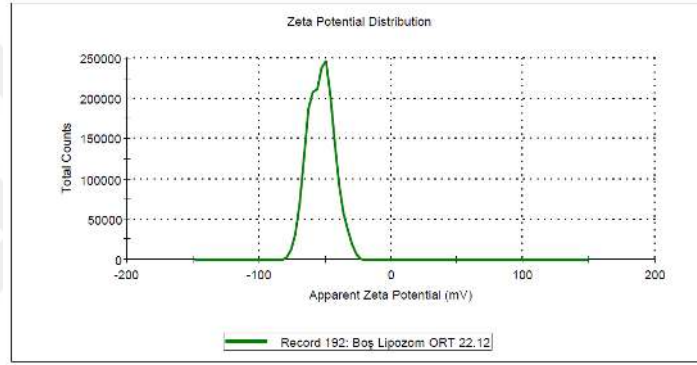
Ekstre, ekstre yüklü lipozom ve boş lipozomların karakterizasyonu için Zeta ölçümleri, boyut ölçümleri yapıldı ve SEM görüntüleri alındı.

Boş lipozomların ortalama boyutu 271,6 nm ve PDI ise 0,323 olarak bulundu. Zeta potansiyeli -52,7 mV olarak hesaplandı (Şekil 3.2). Boş lipozomlara ait boyut dağılımı Şekil 3.1' de gösterilmektedir.

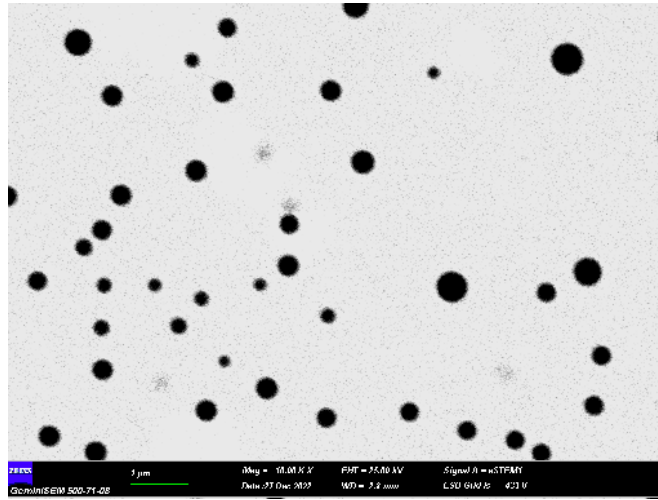
Boş lipozomlara ait SEM görüntüleri Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.1 : Boş lipozomların boyut dağılımı

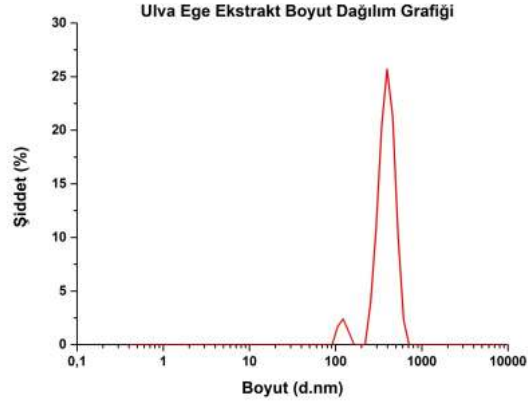


Şekil 3.2 : Boş lipozomların zeta potansiyeli

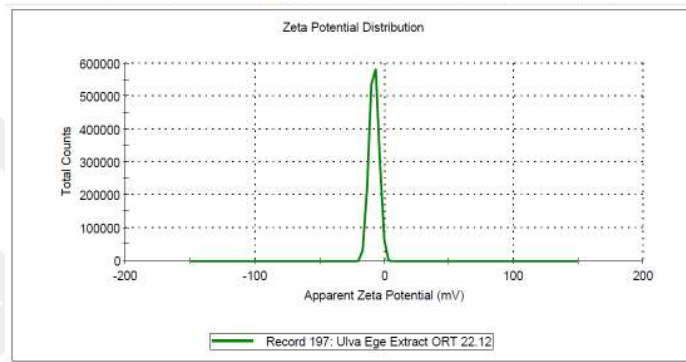


Şekil 3.3 : Boş lipozomların SEM görüntüsü

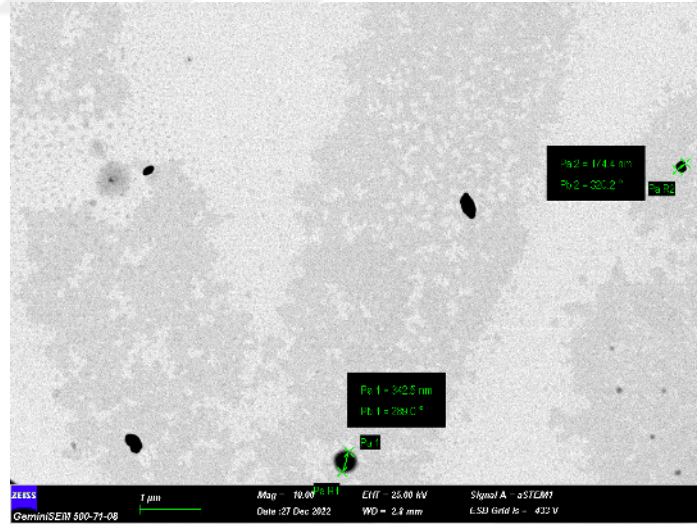
U. lactuca Ege ekstrelerinin ortalama boyutu 1934 nm ve PDI ise 1,000 olarak bulunmuştur. Zeta potansiyeli -7,96 mV olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.5). Ege ekstrelerine ait boyut dağılım grafiği Şekil 3.4'de, SEM görüntüsü Şekil 3.6'da görülmektedir.



Şekil 3.4 : Ege ekstresinin boyut dağılımı

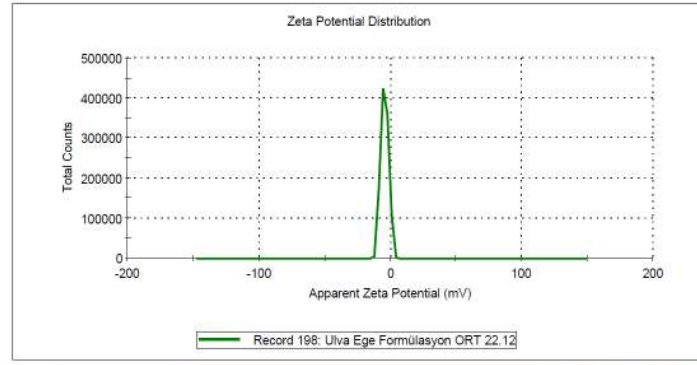


Şekil 3.5 : Ege ekstresinin zeta potansiyeli

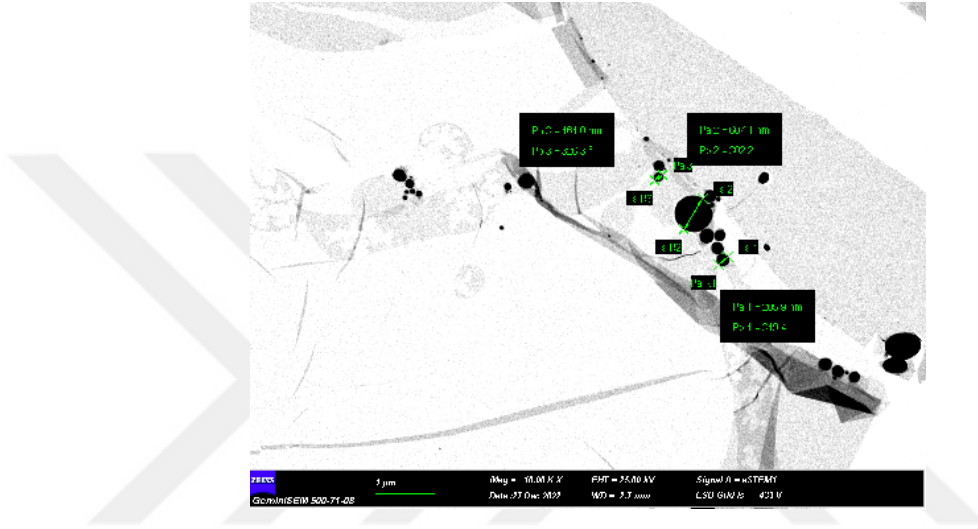


Şekil 3.6 : Ege ekstresinin SEM görüntüsü

Ege ekstre yüklü lipozomun zeta potansiyeli ise -4,32 mV olarak hesaplandı (Şekil 3.7). Ege ekstre yüklü lipozoma ait SEM görüntüsü Şekil 3.8'de görülmektedir.

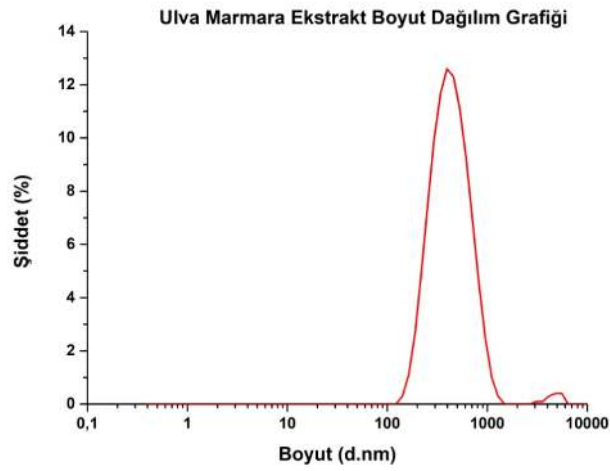


Şekil 3.7 : Ege ekstre yüklü lipozomun zeta potansiyeli

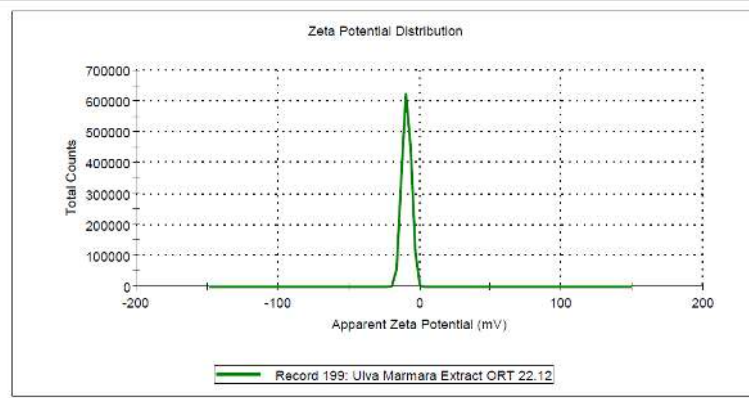


Şekil 3.8 : Ege ekstre yüklü lipozomun SEM görüntüsü

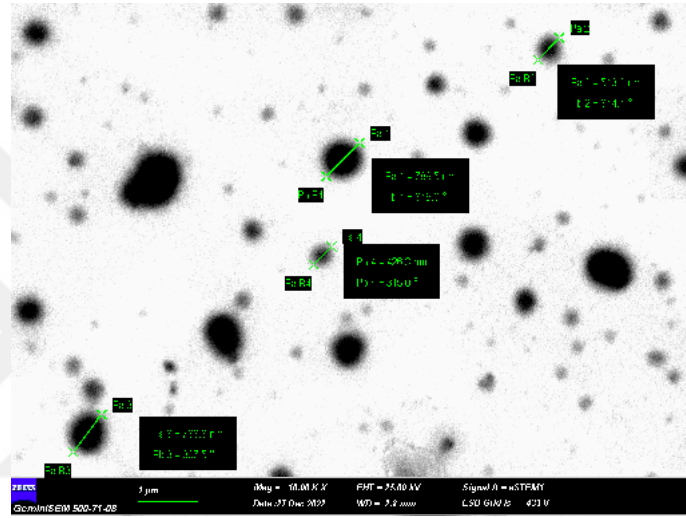
U. lactuca Marmara ekstresinin ortalama boyutu 387,1 nm ve PDI ise 0,206 olarak bulundu. Zeta potansiyeli -9,20 mV olarak hesaplandı (Şekil 3.9). Ekstreye ait boyut dağılımı Şekil 3.8'de ve SEM görüntüleri Şekil 3.10'da görülmektedir.



Şekil 3.9 : Marmara ekstresinin boyut dağılımı

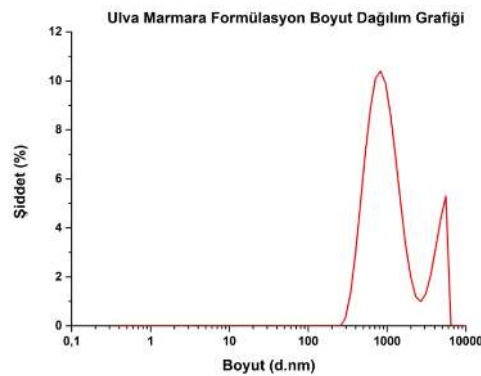


Şekil 3.10 : Marmara ekstresinin zeta potansiyeli

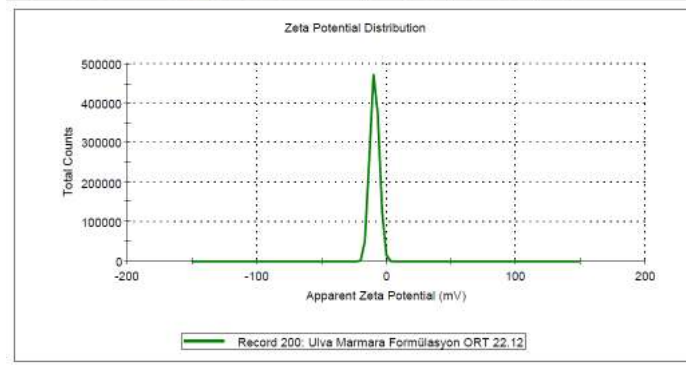


Şekil 3.11 : Marmara ekstresine ait SEM görüntüsü

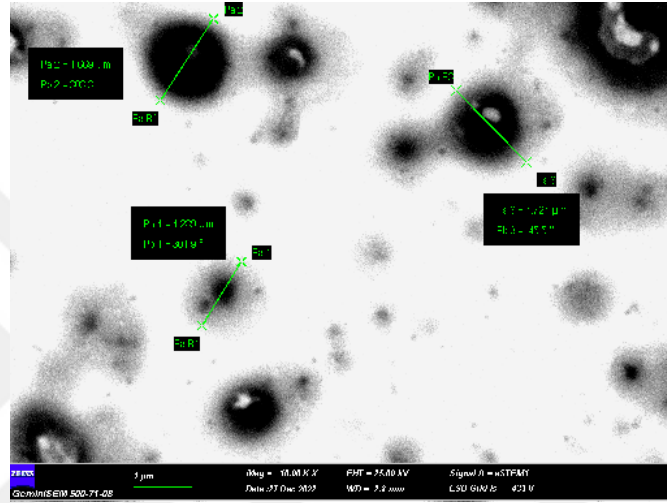
Marmara ekstre yüklü lipozomların ortalama boyutu 1023 nm ve PDI ise 0,371 olarak bulundu. Zeta potansiyeli ise -9,12 mV olarak hesaplandı (Şekil 3.13). Ekstre yüklü lipozomlara ait boyut dağılımı Şekil 3.12'de ve SEM görüntüsü Şekil 3.14'te görülmektedir.



Şekil 3.12 : Marmara ekstre yüklü lipozomların boyut dağılımı



Şekil 3.13 : Marmara ekstre yüklü lipozomların zeta potansiyeli



Şekil 3.14 : Marmara ekstre yüklü lipozomun SEM görüntüsü

Çizelge 3.2’de *U. lactuca* ekstre ve ekstre yüklü lipozomlara ve boş lipozoma ait ortalama boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerine ait veriler görülmektedir.

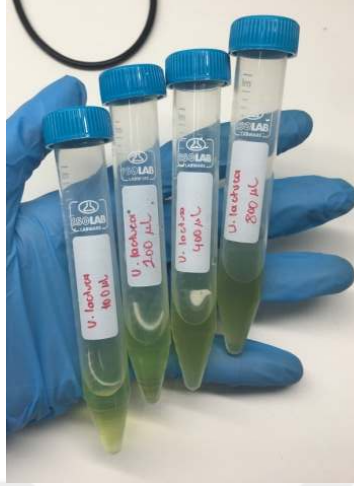
Çizelge 3.2 : Boş lipozom, ekstre ve ekstre yüklü lipozomların boyut dağılımı, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksleri

	Ortalama Boyut (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	PDI
Boş Lipozom	271,6	-52,7	0,323
Marmara Ekstresi	387,1	-9,20	0,206
Marmara EkstreYüklü Lipozom	1023	-9,12	0,371
Ege Ekstresi	1934	-7,96	1,000
Ege Ekstre Yüklü Lipozom	NA	-1,32	NA

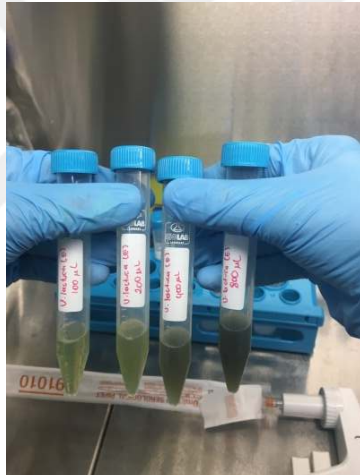
3.3 Ekstrelerin Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

TPC miktarı belirlenirken reaktifteki molibden merkezi, mavi bir renk üretmek için bir antioksidan ile donanmış Mo (VI)'dan Mo (V)'ye indirgenir. *U. lactuca* Marmara

ve Ege alg ekstrelerinin TPC'sine ait renk değişimleri Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da görölmektedir.



Şekil 3.15 : *Ulva lactuca* Marmara alg materyalinin TPC'ye ait renk değişimi



Şekil 3.16 : *Ulva lactuca* Ege alg materyalinin TPC'sine ait renk değişimi

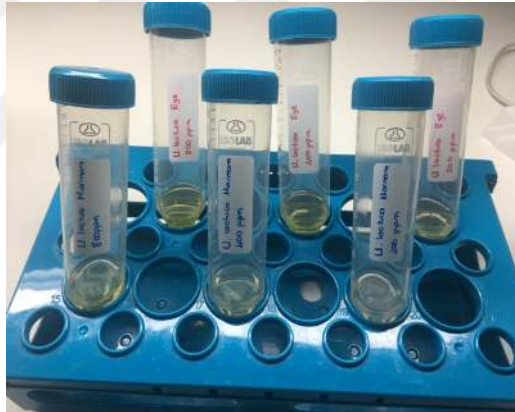
TPC miktarının belirlenmesi için ekstrelerden 100-200-400-800 µg/mL konsantrasyonlarda solüsyonlar hazırlandı. İki ekstreye ait her konsantrasyonun TPC'si çizelge 3.3'de görölmektedir. Bu sonuçlara göre Ege'ye ait ekstrenin TPC miktarı Marmara'ya ait ekstresinin TPC miktarından daha yüksektir. Boisvert ve diğ. (2015) *U. lactuca* ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonunda TPC miktarını 6,9 mg GAE/g olarak hesaplamıştır. Farvin ve diğ. (2019) *U. lactuca* etanolik (%50) ekstresinin TPC miktarını 6,6 mg GAE/g olarak bildirmişlerdir. Bu verilerle karşılaştırıldığında şu an ki çalışmada *U. lactuca* etanolik ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonunda özellikle Ege örneğinin TPC miktarı daha yüksek bulunurken Marmara örneği bu değerlerle paraleldir.

Çizelge 3.3 : *Ulva lactuca* Marmara ve Ege alg ekstrelerine ait TPC (mg GAE/g) değerleri

Ekstre	TPC (mgGAE/g)			
	Konsantrasyon (µg/mL)			
	100	200	400	800
Marmara	5.306	6.917	8.022	6.698
Ege	7.5	9.16	10.26	8.79

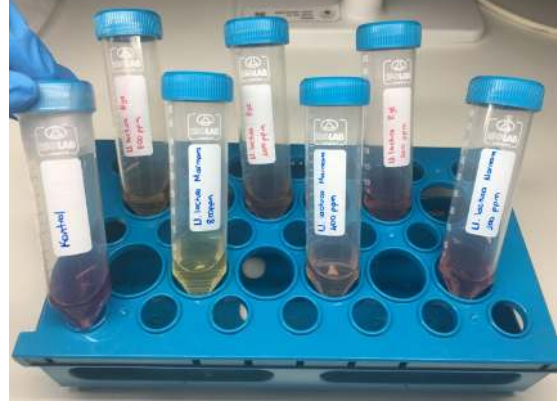
3.4 Ekstre Ve Ekstre Yüklü Lipozom Formülasyonunun DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Ekstrenin DPPH radikal süpürme aktivitesi ile antioksidan kapasitesinin belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlarda (200-400-800 µg/mL) ekstre solüsyonları hazırlandı (Şekil 3.17). Bu solüsyonlara taze olarak hazırlanan DPPH solüsyonundan eklenerek 1 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

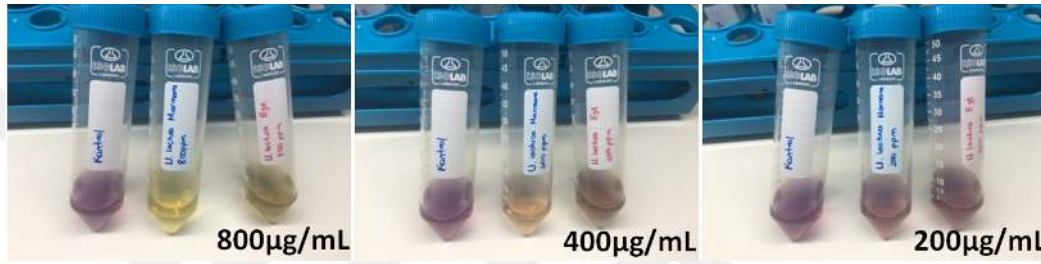


Şekil 3.17 : DPPH radikali eklenmeden önce ekstrelerin görünümü

DPPH metodunda koyu mor renkli DPPH solüsyonu eklenen ekstrelerin radikali indirgemesiyle birlikte rengini açık sarı renge dönüştürmesi beklenmektedir. Marmara ve Ege ekstrelerinin radikali indirgeme yetenekleri öncelikle renk değişimlerine bakılarak saptandı. Şekil 3.18'de arka sırada Ege ön sırada Marmara örneklerinin renk değişimleri görülmektedir. Buna göre özellikle 800 µg/mL konsantrasyonda *U. lactuca* Marmara ekstrelerinin aynı konsantrasyondaki Ege ekstrelerine kıyasla daha fazla indirgemeye sebep olduğu daha açık sarı renge dönmesiyle açıklanabilir (Şekil 3.19).



Şekil 3.18 : DPPH radikali eklendikten 1 saat sonraki renk değişimi



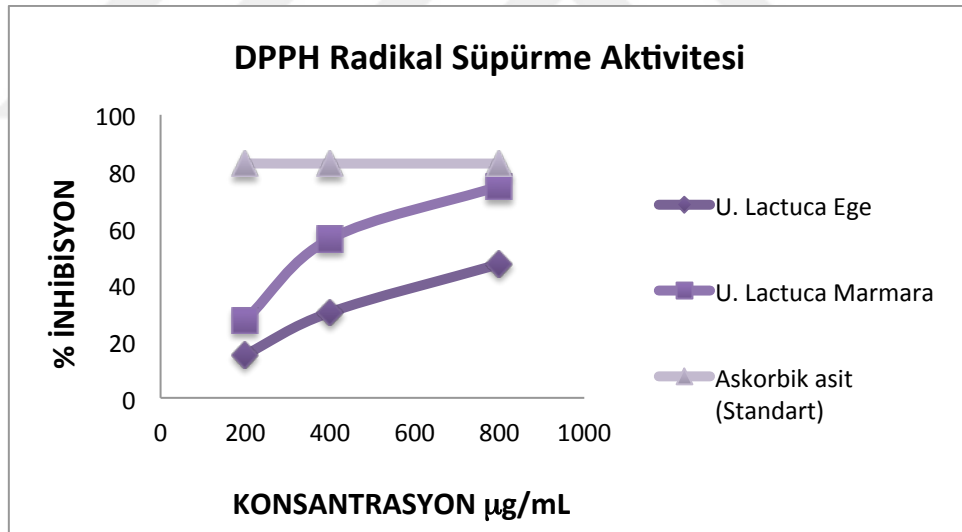
Şekil 3.19 : İnkübasyon süresi sonunda *Ulva lactuca* Marmara ve Ege ekstraktlarının kontrol ile karşılaştırılması

İnkübasyon süresi sonunda bu konsantrasyonların her birinin UV-vis spektrofotometre ile 517 nm dalga boyunda 3'er tekrarlı ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen absorbans değerleri Denklem 2'de yerlerine yazılarak örneklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi (%) hesaplandı. Konsantrasyonlara ait %inhibisyon değerleri Şekil 3.20'de belirtilmiştir. *U. lactuca* Marmara ekstresinin 200 µg/mL, 400 µg/mL ve 800 µg/mL konsantrasyonlarının radikal süpürme aktiviteleri (%) sırasıyla 27,42, 56,14 ve 74,76 olarak hesaplandı. *U. lactuca* Ege ekstresinin ise 200 µg/mL, 400 µg/mL ve 800 µg/mL konsantrasyonlarının radikal süpürme aktiviteleri (%) sırasıyla 15,23, 30,20 ve 47,26 olarak hesaplandı. Khairy ve El-Sheikh (2015) *U. lactuca* ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonunda %33'lük DPPH radikal süpürme aktivitesi bildirmiştir. Boisvert ve diğ. (2015) ise *U. lactuca* etanol ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonunda DPPH radikal süpürme aktivitesini %52 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında mevcut çalışmada hem Marmara hem de Ege ekstraktlarının DPPH radikal temizleme aktiviteleri düşük bulunmuştur.

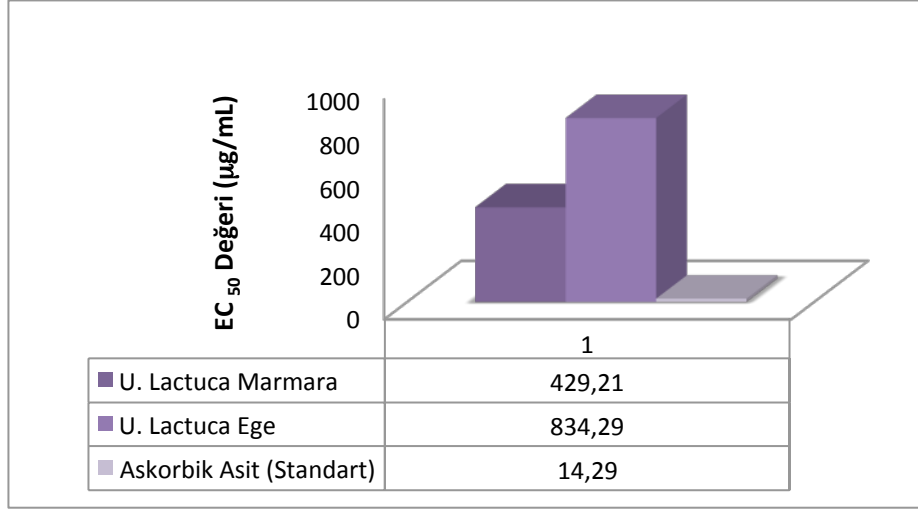
Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak ayrıca Excel üzerinde x(özüt konsantrasyonu), y (DPPH inhibisyonu (%)) grafiğini çizildi ve veriler düz bir çizgiyle (doğrusal

regresyon) sığdırıldı. Buradan elde edilen $a * X + b$ denklemi yardımıyla, Denklem 3'te veriler yerine koyularak EC_{50} değerleri hesaplandı.

U. lactuca Marmara ekstresi, *U. lactuca* Ege Denizi ekstresi ve standart bir antioksidan olan askorbik asite ait EC_{50} değerleri sırasıyla 429,21 $\mu\text{g/mL}$, 834,29 $\mu\text{g/mL}$ ve 14,29 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. Ekstreler ve askorbik asite ait EC_{50} değerleri Şekil 3.21'de gösterilmiştir. Bu verilere göre *U. lactuca* Marmara ekstresi Ege ekstresine kıyasla daha etkili radikal süpürme aktivitesine sahiptir. Bununla birlikte her iki ekstre de standart bir antioksidan olan askorbik asit kadar etkili radikal süpürme aktivitesine sahip değildir. Farvin ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada *U. lactuca* etanolik ekstresinin (%50) EC_{50} değerini 1,428 mg/mL konsantrasyonu olarak ifade etmişlerdir. Alagan ve diğ. (2017) ise *U. lactuca* metanol ekstresinde EC_{50} değerini 81,36 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplamışlardır. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında mevcut çalışmadaki verilerin bu Farvin ve diğ.(2019) elde ettikleri sonuçtan daha etkili ve Alagan ve diğ.(2017) yaptıkları çalışmaya kıyasla daha etkisiz bulundu.



Şekil 3.20 : *Ulva lactuca* Marmara ve Ege ekstrelerinin Radikal Süpürme Aktivitesi (%)



Şekil 3.21 : *Ulva lactuca* Marmara ve Ege ekstrelerinin EC₅₀ değerleri

Ayrıca ekstrelerin lipozom formülasyonu ile birlikte antioksidan etkiye negatif yönde etki edip etmediğinin saptanabilmesi için farklı bir prosedürle ekstre ve ekstre yüklü lipozomun DPPH radikal süpürme aktivitesi (%) hesaplandı. Bunun için ekstre ve ekstre yüklü lipozomların farklı konsantrasyonlarda (200-400-800 µg/mL) solüsyonları hazırlandı. Her bir ekstre ve ekstre yüklü lipozom UV-vis spektrofotometre ile 517 nm dalga boyunda 3'er tekrarlı olarak ölçümleri yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri ile Denklem 2 üzerinden % İnhibisyon değerleri hesaplandı. Ekstre ve ekstre yüklü lipozom %inhibisyon değerleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. *U. lactuca* ekstrelerine ait lipozom formülasyonu için literatürde DPPH radikal süpürme aktivitesi tayini çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, lipozom formülasyonuna dahil olduğunda ekstrenin antioksidan etkisinde kayda değer bir kayıp görülmemektedir. Bununla birlikte doz azaldığında Marmara ve Ege'ye ait ekstrelerin antioksidan seviyesi arasında çok büyük miktarlarda fark görülmemektedir. Bu verilere göre lipozomal sistemle geliştirilen terapötik maddelerin antioksidan etkilerinin azalmadan korunduğu sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 3.4 : Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların % İnhibisyon değerleri

			Konsantrasyon (µg/mL)		
			200	400	800
%İnhibisyon Değeri	Marmara	Ekstre	38,96	38,96	39,98
		Formülasyon	34,17	36,72	39,37
	Ege	Ekstre	37,95	38,75	38,96
		Formülasyon	33,06	36,32	38,96

3.5 Ekstre Ve Ekstre Yüklü Lipozom Formülasyonunun Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

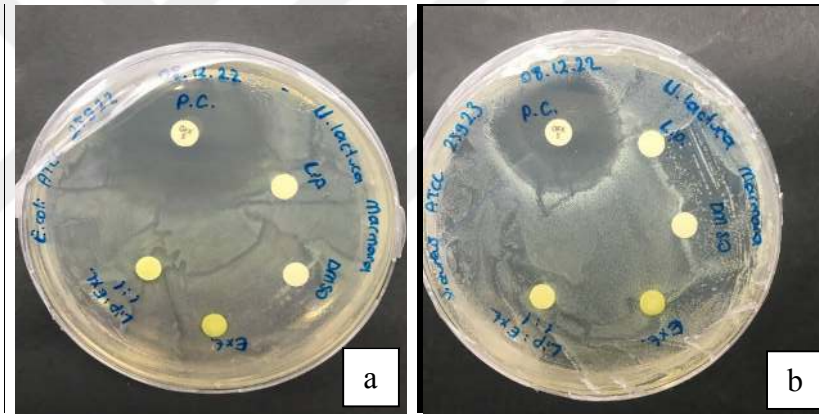
Ekstre ve ekstre yüklü lipozom formülasyonunun antibakteriyel etkinliğinin belirlenebilmesi için öncelikle disk difüzyon testi, ardından sırasıyla MİK ve MBK testleri yapıldı. Her test grubu için mikroorganizma modeli olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 25922 bakterileri üzerinden değerlendirme yapıldı.

3.5.1 Disk difüzyon testi ile inhibisyon çapının belirlenmesi

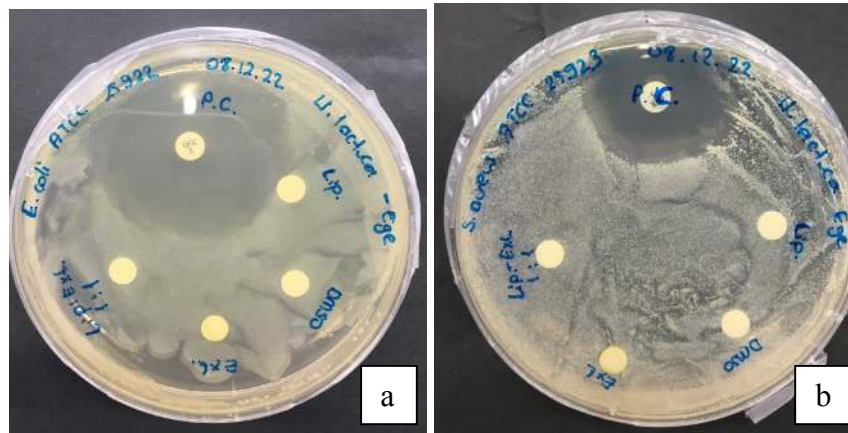
Marmara ve Ege Denizi'nden toplanan *U. lactuca* alg materyallerinin ekstre ve ekstre yüklü lipozom konsantrasyonları 0,005 mg/µL olarak hazırlandı. Bu örneklerle ait karşılaştırmalı disk difüzyon test sonuçları Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre *U. lactuca* alg ekstre ve ekstre yüklü lipozomlarının inhibisyon çapları çizelge 3.5'te verilmiştir. Yaklaşık olarak disk çapı kadar mikroorganizma üremesinin inhibe edildiği bulundu. Literatürdeki disk difüzyon çalışmalarına kıyasla çalışmadaki ekstre ve ekstre yüklü lipozomların etkili antibakteriyel etki göstermediği bulundu. Yine de daha net bir sonuç için broth dilüsyon yöntemi ile de antibakteriyel etki değerlendirilmesi yapıldı.

Çizelge 3.5 : Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların inhibisyon çapları

	İnhibisyon Çapı (mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	1.Tekrar	2.Tekrar	1.Tekrar	2.Tekrar
Boş lipozom	NA	NA	NA	NA
Marmara Ekstresi	8	8	8	8
Marmara Ekstre Yüklü Lipozom	8	8	8	8
Ege Ekstresi	8	8	8	8
Ege Ekstre Yüklü Lipozom	8	8	8	8
Pozitif kontrol (Oflaksasin)	26	25	32	32



Şekil 3.22 : Marmara ekstresinin *E. coli* ATCC 25922 (a) ve *S. aureus* ATCC 25923(b)'a karşı disk difüzyon test sonuçları



Şekil 3.23 : Ege ekstresinin *E. coli* ATCC 25922 (a) ve *S. aureus* ATCC 25923 (b)'a karşı disk difüzyon test sonuçları

Abdel-Khaliq ve diğ. (2014) *U. lactuca* etanolik (%70) ekstresinde *S. aureus* bakterisine karşı 22 mm ve *E. coli* bakterisine karşı 20 mm inhibisyon çapı hesaplamıştır. Alagan ve diğ. (2017) *U. lactuca* metanol ekstresinin *E. coli* bakterisine karşı 10 ve *S. aureus* bakterisi için 13 mm inhibisyon çapı belrilemiştir. Kandhasamy ve Aranculam (2008) ise yaptıkları çalışmada *U. lactuca* türünün metanol ekstresinin *S. aureus* bakterisine karşı 17 mm inhibisyon çapı sergilediğini ve *E. coli* bakterisi karşısına ise hiç etkisi olmadığı belirtilmiştir. Tüm bu çalışmalar aynı bakteri türlerine karşı oldukça farklı sonuçlar sergilendiğini göstermektedir. Mevcut çalışmada hem *E. coli* ATCC 25922 hem de *S. aureus* ATCC 25923 bakterileri için 8 mm inhibisyon çapı belirlendi. Tüney ve diğ. (2006) taze alg ekstrelerinin kurutulmuş alg ekstrelerine kıyasla çalışmadaki patojenlerde daha etkili olduğunu bildirmiştir. Yapılan ekstraksiyon metodu, örneklerin taze olup olmaması veya alglerin toplandığı mevsim alglerin etkinliği üzerinde etkiye sahip olabilir (Khairy ve El-Sheikh, 2015).

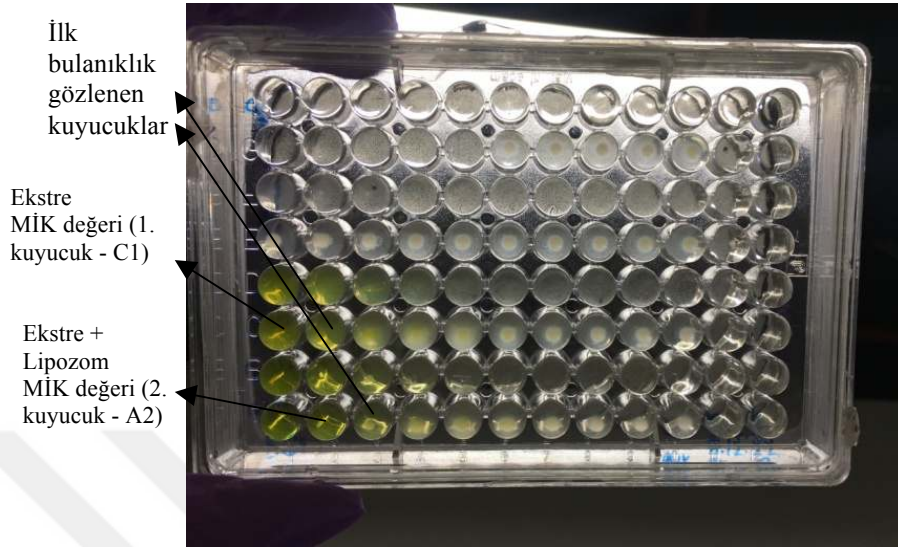
3.5.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerlerinin saptanması

MİK testi için 0,01 mg/μL konsantrasyonunda ekstre solüsyonu elde edildi. Bu solüsyondan 500 μL çekilip üzerine 500 μL lipozom eklenerek vortex işlemiyle ekstre yüklü lipozom elde edildi. Konsantrasyonları eşitlemek için başlangıçtaki ekstre solüsyonuna 500 μL steril ultra distile su eklendi. Böylelikle ilk kuyucuklardaki madde konsantrasyonları hem ekstre hem de ekstre yüklü lipozom formülasyonunun konsantrasyonları 2500 μg/mL olarak hesaplandı. İlk kuyucuktan 9. kuyucuğa kadar başlangıç konsantrasyonu her kuyucukta yarı yarıya seyreltilerek ekstrele ait MİK değeri belirlenmeye çalışıldı.

MİK deneyinde, meydana gelen bulanıklık gözle tayin edilerek bir tahmin yürütüldü. Daha sonra net sonucu görebilmek için mikroparka okuyucuda kuyucukların absorbansı okutuldu.

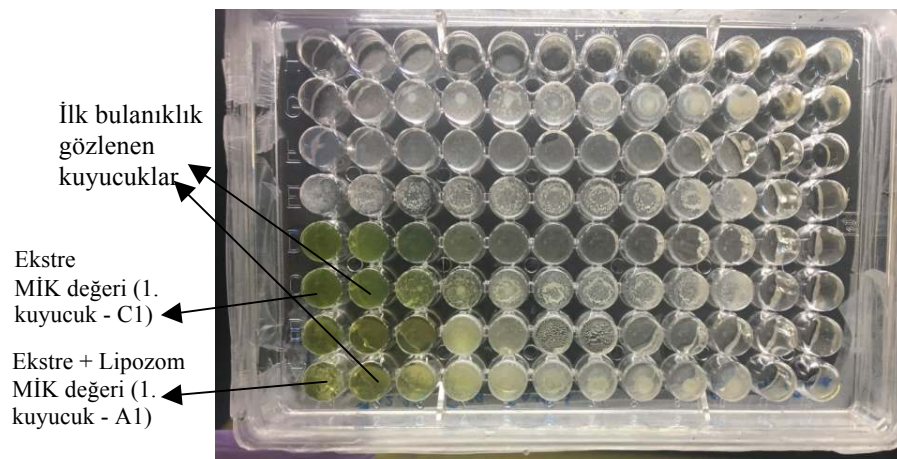
Şekil 3.24'de *U. lactuca* Marmara ekstresinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MİK test sonucu görülmektedir. Göz ile bulanıklık ve üremeye dayalı yapılan ilk değerlendirme sonucunda Marmara örneğine ait lipozomal formülasyonun MİK değeri A2 numaralı kuyucuk olarak görülmekte ve A3 numaralı kuyucuk itibariyle gözle görülür büyüme mevcuttur. Ekstreye ait MİK değeri ise C1 numaralı kuyucuk

olarak belirlendi ve C2 numaralı kuyucuk dahil olmak üzere sonraki kuyucuklarda gözle görülür büyüme görülmektedir. Pozitif kontrol oflaksasinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MİK değeri ise G5 numaralı kuyucuk olarak belirlendi.



Şekil 3.24 : Marmara ekstresinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MİK testi

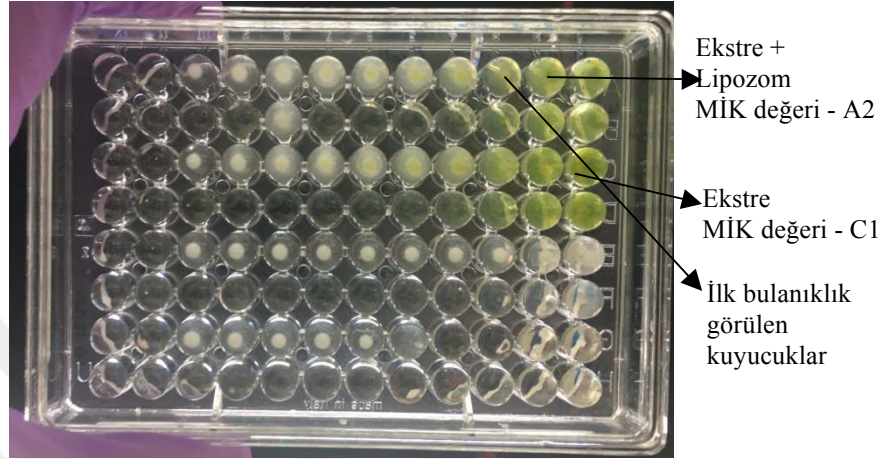
Şekil 3.25'de *U. lactuca* Marmara ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MİK test sonucu görülmektedir. Göz ile bulanıklık ve üreme ye dayalı yapılan ilk değerlendirme sonucunda Marmara örneğine ait lipozomal formülasyonun MİK değeri A1 numaralı kuyucuk olarak görülmekte ve A2 numaralı kuyucuk itibariyle gözle görülür bulanıklık mevcuttur. Ekstreye ait MİK değeri ise C1 numaralı kuyucuk olarak belirlendi ve C2 numaralı kuyucuk itibariyle gözle görülür bulanıklık mevcuttur. Pozitif kontrol ise G2 numaralı kuyucuk olarak belirlendi.



Şekil 3.25 : Marmara ekstresinin *S. aureus* ATCC 26923'e karşı MİK testi

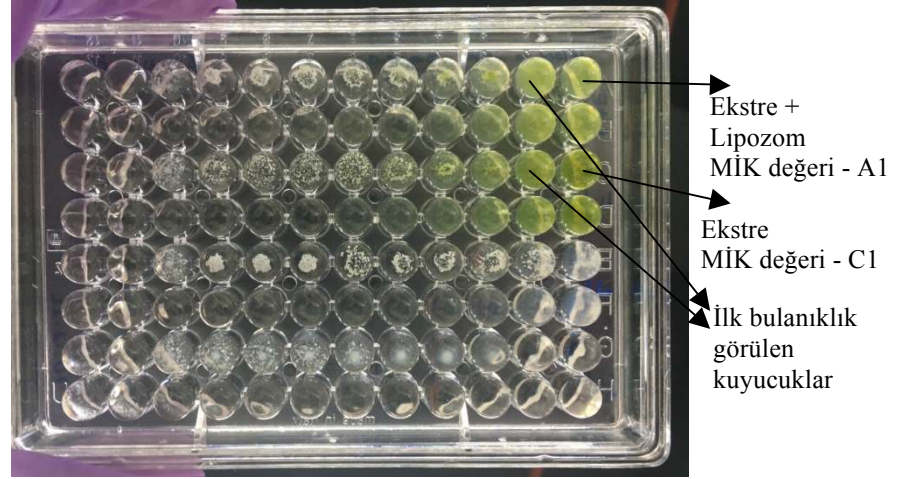
Şekil 3.26'da *U. lactuca* Ege ekstresinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MİK test sonucu görülmektedir. Göz ile bulanıklık ve üremeye dayalı yapılan ilk

değerlendirme sonucunda Ege örneğine ait lipozomal formülasyonun MİK değeri A2 numaralı kuyucuk olarak görülmekte ve A3 numaralı kuyucuk itibariyle bulanıklık gözlenmektedir. Ekstreye ait MİK değeri ise C1 numaralı kuyucuk olarak belirlendi ve C2 numaralı kuyucuk itibariyle bulanıklık gözlenmektedir. Pozitif kontrol ise G5 numaralı kuyucuk olarak belirlendi.



Şekil 3.26 : Ege ekstresinin *E. coli* ATCC 26922'ye karşı MİK testi

Şekil 3.27'de *U. lactuca* Ege ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MİK test sonucu görülmektedir. Göz ile bulanıklık ve üreme ye dayalı yapılan ilk değerlendirme sonucunda Ege örneğine ait lipozomal formülasyonun MİK değeri A1 numaralı kuyucuk olarak görülmekte ve A2 numaralı kuyucuktan itibaren bulanıklık gözlenmektedir. Ekstreye ait MİK değeri ise C1 numaralı kuyucuk olarak belirlendi ve C2 numaralı kuyucuktan itibaren bulanıklık olduğu görülmektedir. Pozitif kontrol ise G2 numaralı kuyucuk olarak belirlendi.



Şekil 3.27 : Ege ekstrelerinin *S. aureus* ATCC 26923'e karşı MİK testi

Tüm bu sonuçlara göre her bir ekstreye ait MİK ve MBK değerleri hesaplandı (Çizelge 3.6). MİK değerleri karşılaştırıldığında hem Marmara hem de Ege ekstre yüklü lipozomların MİK değerleri 1250 $\mu\text{g/mL}$ ile ekstrelerin MİK değerlerinden daha düşüktür. Burada lipozom formülasyonu ile daha etkili antibakteriyel sonuç alındığı kanıtlandı. Ayrıca her iki denize ait örnek de *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı daha etkilidir.

Çizelge 3.6 : Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların MİK ve MBK değerleri

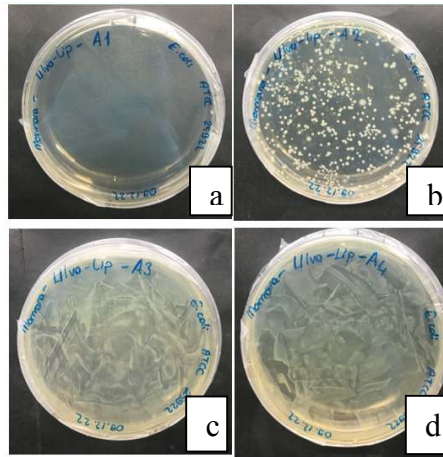
		MİK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)		MBK değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
EKSTRE					
Marmara	Ekstre + Lipozom	1250	2500	2500	>2500
	Ekstre	2500	2500	>2500	>2500
Ege	Ekstre + Lipozom	1250	2500	2500	>2500
	Ekstre	2500	2500	>2500	>2500

Boisvert ve diğ. (2015) *U. lactuca* etanolik ekstrelerini 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda *E. coli* için %69,5 ile inhibisyonunu bildirmiştir. Alagan ve diğ. (2017) ise *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri için MİK değerlerini sırası ile 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 500 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulmuştur. Mevcut çalışmamızda ise hem marmara hem de Ege ekstrelerinin *S.*

aureus ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 25922 için MİK değerleri 2500 µg/mL olarak hesaplandı. Her iki örneğin de lipozomal formülasyonları ekstrelerle kıyasla 1250 µg/mL konsantrasyonla *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 25922 için daha etkilidir. Daha önce bahsedilen literatür çalışmalarına kıyasla ise daha az etkili olduğu görüldü.

Test maddelerinin bakterilerin gelişimini engellediği (>%90) MİK değerlerinin belirlenmesinin ardından MBK (>%99.9) değerleri bulundu. Bunun için seçilen MİK değerlerinin üzerinde olan konsantrasyonlar NA plakalara yayma ekim yöntemi ile ekildi. Ekimin ardından 24 saat sonra NA plakalarda koloni oluşup oluşmadığı belirlendi. Buna göre *E.coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 için ekstre ve ekstre yüklü lipozomdan MİK üzeri kuyucuklar ve bulanıklığı doğrulamak amacıyla MİK değerinin altındaki 2 kuyucuktan da ekim yapıldı.

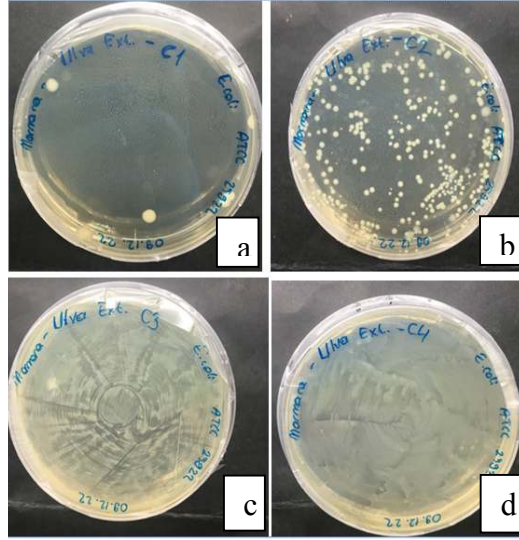
U. lactuca Marmara alg ekstre yüklü lipozomun *E.coli* ATCC 25922'ye karşı MİK değeri A2 kuyucuğuydu. A1-A2-A3-A4 kuyucuklarından ekim yapıldı. Sonuçlar Şekil 3.28'de görülmektedir. Sonuçlara göre A1 numaralı kuyucuktan yapılan ekim sonucunda üreme olmadığı ve A2 kuyucuğunda koloniler halinde üremeler görülmektedir. Buna göre Marmara ekstre yüklü lipozomun *E.coli* ATCC 25922'ye karşı MBK değeri A1 kuyucuğu yani 2500 µg/mL'dir.



Şekil 3.28 : Marmara ekstre yüklü lipozomun *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

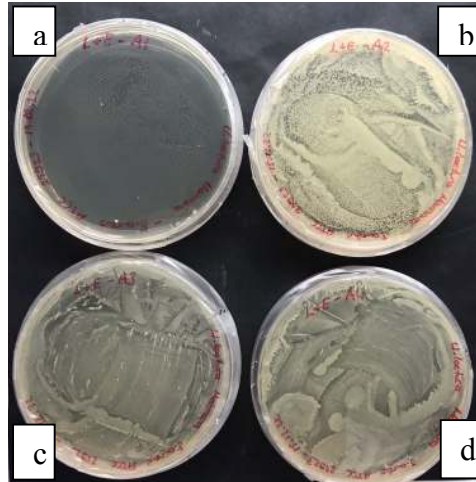
Ekstre için ise C1 kuyucuğunda tek koloni halinde üreme görülmektedir (Şekil 3.29).

Ekstre için MBK değeri 2500 µg/mL üzerindedir.



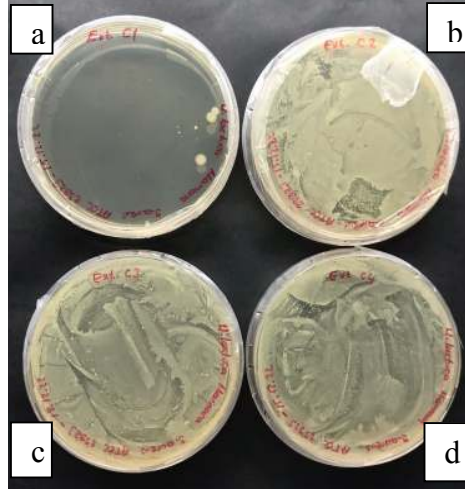
Şekil 3.29 : Marmara ekstresinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

U. lactuca Marmara alg ekstre ve ekstre yüklü lipozom formülasyonlarının *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları Şekil 3.30 ve Şekil 3.31'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre ekstre yüklü lipozomda A1 numaralı kuyucukta tek koloni halinde üreme görülmekte ve A2-A3-A4 numaralı kuyucuklarda ise yayılmış bir üreme görülmektedir (Şekil 3.30). Buna göre Marmara ekstre yüklü lipozomun MBK değeri 2500 µg/mL'nin üzerindedir.



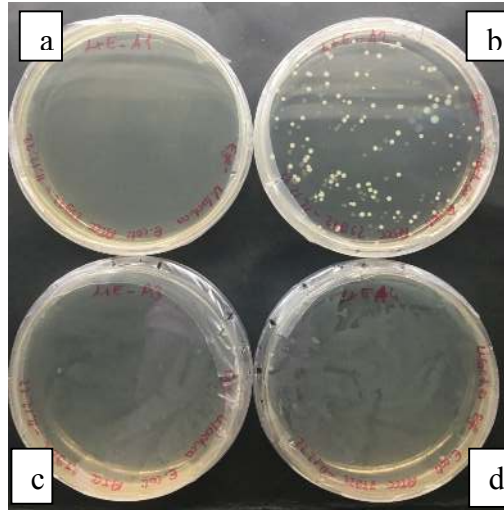
Şekil 3.30 : Marmara ekstre yüklü lipozomun *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

Marmara'ya ait alg ekstresinde (Şekil 3.31) ise C1 kuyucuğunda koloni halinde üremeler görülmektedir. Bu sonuca göre Marmara ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK değeri 2500 µg/mL'nin üzerindedir.



Şekil 3.31 : Marmara ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

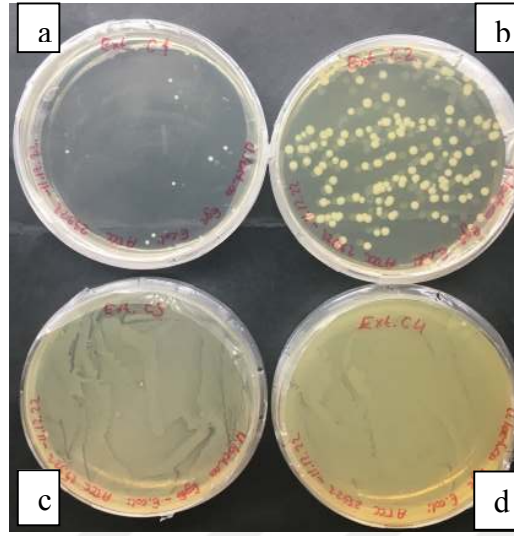
U. lactuca Ege'ye ait ekstre ve ekstre yüklü lipozom formülasyonlarının *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları Şekil 3.32 ve Şekil 3.33'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre ekstre yüklü lipozomun A1 kuyucuğunda üreme görülmemekte, A2 kuyucuğunda koloniler halinde ve A3-A4 kuyucuklarında yayılmış halde üreme görülmektedir (Şeki 13.32). Buna göre *U. lactuca* Ege ekstre yüklü *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK değeri 2500 µg/mL'dir.



Şekil 3.32 : Ege ekstre yüklü lipozomun *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

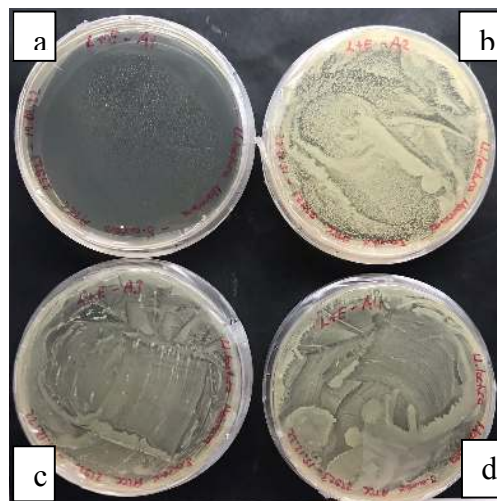
U. lactuca Ege ekstresinin *E.coli* ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçlarına göre C1 kuyucuğunda 8 adet koloni halinde üreme, C2 kuyucuğunda çok sayıda koloni üremesi ve C3-C4 kuyucuklarında yayılmış halde üremeler görülmektedir (Şekil

3.33). Bu sonuca göre Ege ekstresinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK değeri 2500 µg/mL'nin üzerindedir.



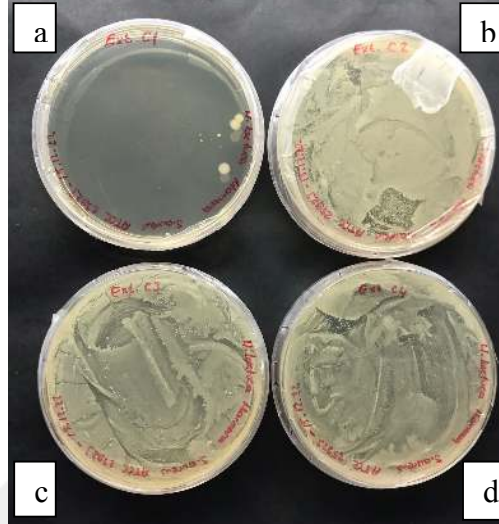
Şekil 3.33 : Ege ekstresinin *E. coli* ATCC 25922'ye karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

U. lactuca Ege'ye ait ekstre ve ekstre yüklü lipozom formülasyonunun *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları Şekil 3.34 ve 3.35'te gösterilmiştir. *U. lactuca* Ege ekstre yüklü lipozomun A1 kuyucuğunda tek koloni üremesi ve A2-A3-A4 kuyucuklarında ise yayılmış şekilde üremeler görülmektedir (Şekil 3.34). Buna göre Ege'ye ait ekstre yüklü lipozomun *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK değeri 2500 µg/mL üzerindedir.



Şekil 3.34 : Ege ekstre yüklü lipozomun *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; A1 kuyucuğundan ekilen petri (a), A2 kuyucuğundan ekilen petri (b), A3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve A4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

U. lactuca Ege ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı C1 kuyucuğunda büyük koloni üremeleri ve C2-C3-C4 kuyucuklarında ise yayılmış şekilde üremeler görülmektedir (Şekil 3.35). Buna göre Ege ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK değeri 2500 µg/mL'nin üzerindedir.



Şekil 3.35 : Ege ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923'e karşı MBK sonuçları; C1 kuyucuğundan ekilen petri (a), C2 kuyucuğundan ekilen petri (b), C3 kuyucuğundan ekilen petri (c) ve C4 kuyucuğundan ekilen petri (d)

MBK sonuçlarına göre her bir örnek için MBK değeri MİK değerinden yaklaşık iki kat daha fazla bulundu. Ayrıca MBK değerleri MİK değerleri ile paralellik gösterdi. Yani MBK değerlerinde de ekstre yüklü lipozomlar ekstrele göre hem *E. coli* ATCC 25922 hem de *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına karşı daha etkilidir. Bunun dışında MBK sonuçlarına göre hem Marmara hem de Ege ekstre yüklü lipozomlar 2500 µg/mL'lik konsantrasyonla birlikte *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı daha etkilidir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ekstre ve ekstre yüklü lipozomların antioksidan aktiviteleri kıyaslandığında formülasyonun antioksidan etkinin gösterilmesinde bir engel oluşturmadığı ve ekstre ile çok yakın değerlerde radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu bulundu. *U. lactuca*'nın Marmara ve Ege denizlerinden toplanan örneklerinin antioksidan aktiviteleri incelendiğinde Marmara ekstresinin radikal süpürme aktivitesi çok daha yüksektir. Marmara ve Ege ekstrelerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 429,21 µg/mL, 834,29 µg/mL olarak hesaplandı.

Antibakteriyel etkinlikte disk difüzyon testinde 0,005 mg/µL konsantrasyonunda ekstre ve ekstre yüklü lipozom formülasyonu test edildiğinde 8 mm inhibisyon çapı belirlendi. MİK testinde özellikle lipozomal formülasyonun 1250 µg/mL konsantrasyonda *E. coli* ATCC 25922'ye karşı etkili olduğu kanıtlandı. Her iki denize ait örneğin de *E. coli* ATCC 25922'ye karşı 2500 µg/mL konsantrasyonda MBK olarak bulundu. Bunun dışında her iki denize ait örnek de *S. aureus* ATCC 25923'e karşı 2500 µg/mL konsantrasyonun üzerinde MBK değerine sahiptir. Sonuç olarak lipozomal formülasyonun ekstreye kıyasla daha etkili antibakteriyel etki gösterdiği bulundu.

Hem antioksidan hem de antibakteriyel test sonuçları göz önüne alındığında lipozom formülasyonunun biyouyumlu, biyobozunur olması ve toksik olmamasının yanı sıra ekstrenin antioksidan özelliğini koruduğunu ve antibakteriyel etkinliğini koruyarak terapötik etkinliğini artırdığı kanıtlandı. Tez çalışmasının sonuçlarına göre lipozomal formülasyonun *U. lactuca* türünden antibakteriyel ve antioksidan ürün geliştirme amaçlı tercih edilebileceği ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Khaliq, A., Hassan, H.M., Rateb, M.E., Hammouda, O.** (2014). Antimicrobial Activity of Three Ulva Species Collected from Some Egyptian Mediterranean Seashores. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 2, 648-669.
- Ahmed K.S., Hussein S.A., Ali A.H., Korma S.A., Lipeng Q., Jingua C.** (2019). Liposome: composition, characterization, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, Vol.27, NO.7, 742-761.
- Ajeeshkumar K.K., Aneesh P.A., Raju N., Suseela M., Ravishankar C.N., Benjakul S.** (2021). Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20:1280-1306.
- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Nejati-Koshki K.** (2013). Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8:102.
- Aktar S., Cebe G.E.** (2010). ALGLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ, KULLANIM ALANLARI VE ECZACILIKTA ÖNEMİ. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39(3), 237-264.
- Alagan V.T., Valsala R.N., Rajesh K.D.** (2017). Bioactive Chemical Constituent Analysis, in vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Whole Plant Methanol Extracts of *Ulva lactuca* Linn. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1), 1-14.
- Alam, S., Mattern-Schain, S. I., & Best, M. D.** (2017). Targeting and triggered release using lipid-based supramolecular assemblies as medicinal nanocarriers. In (J. L. Atwood Ed.). *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* (pp. 329–364).
- Al-Amin, M.D., Bellato, F., Mastrotto, F., Garofalo, M., Malfanti, A., Salmaso, S., Caliceti, P.** (2020). Dexamethasone Loaded Liposomes by Thin-Film Hydration and Microfluidic Procedures: Formulation Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1611.
- Albanese A., Tang P.S., Chan W.C.W.** (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14:1–16.

- Alghazeer R., Whida F., Abduehrhman E., Gammoudi F., Azwai S.** (2013). Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Natural Science*, 5, 7-14.
- Allouche F.N.** (2021). A user-friendly Ulva lactuca/chitosan composite bead for mercury removal. *Inorganic Chemistry Communications*, 130, 108747.
- Almgren M., Edwards K., Karlsson G.** (2000). Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 174(1-2):3-21.
- Anderson, M., and Omri, A.** (2004). The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *Drug Delivery*. 11 (1), 33-39. doi:10.1080/10717540490265243
- Anwekar H., Patel S., Singhai A.K.** (2011). Liposome-as drug carriers. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2011, 2(7):945-951.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Bektasoglu B.** (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12:1496.
- Ardağ A.** (2008). Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Arnao M.B.** (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, 11:419.
- Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H., Bast A.** (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42:45.
- Athukorala Y., Nam K., Jeon Y.** (2006). Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga Ecklonia cava. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1065-1074.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K.** (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
- Baranauskaite, J., Duman, G., Corapcıoğlu, G., Baranauskas, A., Taralp, A., Ivanauskas, L. & Bernatoniene, J.** (2018). Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and carvacrol extracted from Oregano (*O. onites* L.). *BioMed research international*, 1-10

- Batzri S., Korn E.D.** (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 298(4):1015–1019.
- Baweja P., Kumar S., Sahoo D., Levine I.** (2016). Chapter 3 - Biology of Seaweeds. *Seaweed in Health and Disease Prevention*, 41-106.
- Benzie I. F. F., Strain J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76.
- Boisvert C., Beaulieu L., Bonnet C., Pelletier E.** (2015). Assessment of the Antioxidant and Antibacterial Activities of Three Species of Edible Seaweeds. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 377-387. doi: 10.1111/jfbc.12146.
- Bozzuto G., Molinari A.** (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 2015:10 975-999
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30.
- Braune, W., and Guiry, M.** (2011). Seaweeds. A colour guide to common benthic green, brown and red algae of the world's oceans. ARG Gantner, Ruggell.
- Brook I., Wexler H.M., Goldstein E.J.** (2013). Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3):526–546.
- Caddeo C., Pucci L., Gabriele M., Carbone C., Fernandez-Busquets X., Valenti D., Pons R., Vassallo A., Fadda A.M., Manconi M.** (2018). Stability, biocompatibility and antioxidant activity of PEG-modified liposomes containing resveratrol. *International Journal of Pharmaceutics*, 538, 40-47.
- Caf, F.; Yilmaz, Ö.; Durucan, F.; Özdemir, N.Ş.** (2015). Biochemical components of three marine macroalgae (*Padina pavonica*, *Ulva lactuca* and *Taonia atomaria*) from the Levantine Sea coast of Antalya, Turkey. *J. Biodivers. Environ. Sci.*, 6, 401–411.
- Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G.** (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14:303-11.
- Cho N.J., Hwang L.Y., Solandt J.J.R., Frank C.W.** (2013). Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-Assembly. *Materials*, 6, 3294-3308.
- Cirik Ş., Cirik S.** (2011). Su bitkileri I-Deniz Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi ve Yetiştirme Teknikleri, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, 58, 135-145.

- Clogston J.D., Patri A.K.** (2011). Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, Methods in Molecular Biology, Vol. 697.
- Çakir Arica Ş., Ozyilmaz A., Demirci S.** (2017). A study on the rich compounds and potential benefits of algae: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 6(12): 42-51.
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom W.C.A., Manley M.** (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 902.
- Deamer D., Bangham A.D.** (1976) Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 443(3):629–634.
- Desai K., Dharaskar S.A., Khalid M., Gupta T.** (2021). Triphenyl methyl phosphonium tosylate as an efficient phase transfer catalyst for ultrasound-assisted oxidative desulfurization of liquid fuel. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(21).
- Devrim B., Kara A., Vural İ., Bozkır A.** (2016). Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: Preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, ISSN: 0363-9045.
- Dobrovolskaia M.A.** (2016). Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: challenges, considerations and strategy. *J Control Release*, 220(00):571-583.
- Dominguez, H.; Loret, E.** (2019). *Ulva lactuca*, a source of troubles and potential riches. *Marine Drugs*, 17, 357.
- Durmaz, Y., Duyar, H.A., Gökpınar, Ş., Öğretmen, Y.Ö., & Bandarar, N.M.** (2008). *Ulva* spp. (Sinop, Karadeniz) türünün yağ asitleri, α tokoferol ve toplam pigment miktarının araştırılması. *Journal of FisheriesScience.com*, 2(3), 350-356.
- Edwards K.A. and Baeumner A.J.** (2006). Analysis of liposomes. *Talanta*, 68, 1432-1441.
- Egelhaaf S.U., Wehrli E., Muller M., Adrian M., Schurtenberger P.** (1996). Determination of the size distribution of lecithin liposomes: a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering. *Journal of Microscopy*, 184, 214–228.
- Egerdie B., Singer M.** (1982). Morphology of gel state phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine liposomes: a negative stain electron microscopic study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 31, 75–85
- El-Baky H.A., El Baz F. K., & El Baroty G.S.** (2008). Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient.

- El-Baky H.H.A., El-Baz F.K., El-Barity G.S.** (2009). Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(9), 1688-1695.
- Ericsson H.M., Sherris J.C.** (1971). Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* , 217(Suppl 217):1+
- Fariñas T. H., Ribeiro L., Soudant D., Belin C., Bacher C., Lampert L., Barillé L.** (2017). Contribution of benthic microalgae to the temporal variation in phytoplankton assemblages in a macrotidal system. *Journal of Phycology*, 53: 1020–1034.
- Farvin K.H.S., Surendraraj A., Al-Ghunaim A., Al-Yamani F.** (2019). Chemical profile and antioxidant activities of 26 selected species of seaweeds from Kuwait coast. *Journal of Applied Phycology*, 31:2653-2668.
- Fawcett D., Verduin J.J., Shah M., Sharma S.B., Poinern G.E.J.** (2017). A Review of Current Research into the Biogenic Synthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles via Marine Algae and Seagrasses. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1–15.
- Filipe V., Hawe A., Jiskoot W.** (2010). Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796-810.
- Folin O. and Ciocalteu V.** (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627–650.
- Ford L.L., Theodoridou K., Sheldrake G.N., Walsh P.** (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 30(4), 1-13.
- Frohlich M., Brecht V., Peschka-Süss R.** (2001). Parameters influencing the determination of liposome lamellarity by ³¹P-NMR. *Chemistry and Physics of Lipids*, 109, 103–112.
- Fukumoto L.R., Mazza G.** (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8):3597.
- Gabizon A., Papahadjopoulos D.** (1988). Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (United States of America)*, 85:6949–6953.
- Gheldof N., Engeseth N.J.** (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical

absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,3050.

- Glazer, A.N.** (1990). Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in Enzymology*, 186: 161-8.
- Godeh, M.M., El-Gahmi, H.A., Bleiblo, A.M., & Said, A.A.** (2017). Antibacterial Activity of methanolic extracts of 5 species of *Ulva* from Benghazi coasts, Libya [Version 1; awaiting peer review]. *Control*, 1, 07.
- Grabielle-Madelmont C., Lesieur S., Ollivon M.** (2003). Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 56, 189–217.
- Gregoriadis G., Davis C.** (1979). Stability of liposomes invivo and invitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 89 (4), 1287–1293.
- Gupta D.** (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546-566.
- Gümüş G.** (2006). Deniz Marulunun Kimyasal Kompozisyonunun Araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- Hamed S.M., Abd El-Rhman A.A., Abdel-RAouf N., Ibraheem I.B.M.** (2018). Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7: 104–110.
- Hauser H.** (1984). Some aspects of the phase behaviour of charged lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 772, 37–50.
- Heatley N.G.** (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, 38, 61-65
- Hernández Fariñas, T.; Ribeiro, L.; Soudant, D.; Belin, C.; Bacher, C.; Lampert, L. and Barillé, L.,** (2017). Contribution of benthic microalgae to the temporal variation in phytoplankton assemblages in a macrotidal system. *J. Phycol.* 53: 1020–1034.
- Hope M.J., Bally M.B., Mayer L.D., Janoff A.S., Cullis P.R.** (1986). Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40, 89–107.
- Huang D., Ou B., Prior R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1841.

- Hunter R.J., Midmore B.R., Zhang H.** (2001). Zeta Potential of Highly Charged Thin Double-Layer Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.237, 147-149.
- İrkin L.C.** (2020). *AKUAKÜLTÜRDE ALGLERİN ÖNEMİ VE KULLANIM ALANLARI*. İKSAD Yayınevi, Ankara.
- Jaulneau V., Lafitte C., Jacquet C., Fournier S., Salamagne S., Briand X., Esquerre-Tugaye M.T., Dumas B.** (2010). Ulvan, a Sulphated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 525291, 11.
- Jorgensen J.H., Ferraro M.J.** (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1749–1755.
- Jousma H., Talsma H., Spies F., Joosten J.G.H., Junginger H.E., Crommelin D.J.A.** (1987). Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 35, 214–263.
- Kagawa Y., Racker E.** (1971). Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 246 (17), 5477–5487.
- Kandhasamy M., Arunachalam K.D.** (2008). Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology*, Vol.7(12), 1958-1961.
- Karadağ A., Özcelik B., Saner S.** (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
- Khairy H.M., El-Sheikh M.A.** (2015). Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 623-630.
- Khorasani, S., Danaei, M., & Mozafari, M.** (2018). Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 106–115.
- Kırtıl E., Öztop M.H.** (2014). Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi. *Akademik Gıda*, 12(4), 41-57.
- Kirby C., Clarke J., Gregoriadis G.** (1980). Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochemical Journal*, 186 (2) 591–598.
- Koudelka S., Turánek J.** (2012). Liposomal paclitaxel formulations. *Journal of Controlled Release*, Vol.163, Issue 3, 322–334.

- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P.** (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46:244.
- Large D.E., Abdelmessih R.G., Fink E.A., Auguste D.T.,** (2021). Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 176, 113851.
- Larrabee A.L., Babiarz J., Laughlin R.G., Geddes A.D.** (1978). Sizing of phosphatidylcholine vesicles by transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 114, 319–327
- Leelavathi M.S., Prasad M.P.** (2014). Evaluation of Antioxidant properties of Marine Sea Weed samples by DPPH method. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(6), 132-137.
- Leitgeb M., Knez Z., Primožic M.** (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, 104984.
- Lewis L.A., McCourt R. M.** (2004). Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, 91, 10, 1535-1556.
- Li J., Wang X., Zhang T., Wang C., Huang Z., Luo X., Deng Y.** (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81-98.
- Louini A., Jaafar-Maalej C., Limayem-Blouza I., Sfar S., Charcosset C., Fessi H.** (2012). Preparation, Characterization and Application of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, Vol.1, 147-168.
- Lundahl P., Zeng C.-M., Lagerquist Hagglund C., Gottschalk I., Greijer E.** (1999). Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722, 103–120.
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L.** (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13):2046.
- Madhujith T., Izydorczyk M., Shahidi F.** (2006). Antioxidant properties of pearled barley fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3283
- Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C.** (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613:1.
- Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R.** (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *BBA – Biomembranes*, 858, 161–168.

- Meure, L. A., Foster, N. R., & Dehghani, F.** (2008). Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review. *Aaps Pharmscitech [Electronic Resource]*, 9(3), 798.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.** (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84:407.
- Morsy G.M.T., Bekhet E.K., Mohamed E.A.** (2020). Phytochemical screening for antibacterial compounds of some seaweed from coastal area of abu-qir , alexandria , egypt phytochemical screening for antibacterial compounds of some seaweed from coastal area of abu-qir , alexandria. *Egyptian Journal of Phycology*, 19: 47-57.
- Munteanu I.G., Apetrei C.** (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- Myant N.B.** (1981). Chapter 3 - The Distribution of Sterols and Related Steroids in Nature, in: N.B. Myant (Ed.), *The Biology of Cholesterol and Related Steroids*, Butterworth-Heinemann, 123-159.
- Nagalingam A.** (2017). Drug Delivery Aspects of Herbal Medicines. *Japanese Kampo Medicines for the Treatment of Common Diseases*, Chapter 15, 143-164.
- Nkanga, C. I., Bapolisi, A. M., Okafor, N. I., & Krause, R. W. M.** (2019). General perception of liposomes: Formation, manufacturing and applications. *Liposomes-advances and perspectives* (pp.31–52).
- Nsairat H., Khater D., Sayed U., Odeh F., Bawab A.A., Alshaer W.** (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8, e09394.
- Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., & Paternostre, M.** (2000). Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1508(1–2), 34–50.
- Ong S.G.M., Chitneni M., Lee K.S., Ming L.C., Yuen K.H.** (2016). Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, 8(4):36.
- Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B.** (2003). Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Journal of Food Science*, 68(2):487.
- Pal A, Kamthania M, Kumar A.** (2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds -A Review. *Open Access Library Journal*, 1:1-17.

- Papahadjopoulos, D., Watkins, J.C.** (1967). Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 135:639-652.
- Patil Y.P., Jadhav S.** (2013). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177(2014):8-18.
- Payne, N.I., Browning, I., Hynes, C.A.,** (1986). Characterization of proliposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4): 330-333.
- Pereira, H. M., Leadley, P. W., Proença, V., Alkemade, R., Scharlemann, J. P., Fernandez-Manjarrés, J. F., Araújo, M. B., Balvanera, P., Biggs, R., and Cheung, W. W.** (2010). Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science* 330, 1496-1501.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K.** (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-302.
- Priya, N.P., Poonguzhali, T.V.** (2015). In vitro antibacterial activity of some extracts from the algae *Ulva lactuca* against pathogenic bacteria, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 4, No. 8, 839-844.
- Rashad S., El-Chagbaby G. A.** (2020). Marine Algae in Egypt: distribution, phytochemical composition and biological uses as bioactive resources (a review). *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 24(5), 147-160.
- Roginsky V., Lissi E.A.** (2005). Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92:235.
- Ruberto G., Baratta M.T., Biondi D.M., Amico V.** (2001). Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal of Applied Phycology*, 13: 403-407. 16.
- Sahil K., Premjeet S., Ajay B., Middha A., Bhawna K.** (2011). STEALTH LIPOSOMES: A REVIEW. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2(5) 15334-1538.
- Sahoo S.K., Labhasetwar V.,** (2003) Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *DDT* 2003, 8:24.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F.** (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76:270. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:23.0.CO;2-9
- Schieren H., Rudolph S., Findelstein M., Coleman P., Weissmann G.** (1978) Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion

- and entrapment analyses. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 542(1):137–153.
- Schubert, R.** (2003). Liposome preparation by detergent removal. *Methods in Enzymology*, 367, 46–70.
- Schumacher A., Vranken T., Malhotra A., Arts J.J.C., Habibovic P.** (2018). In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37:187-208.
- Shahidi F., Liyana-Pathirana C.M., Wall D.S.** (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99(3),478.
- Singleton V.L., Rudolf O., Lamuela-Raventos R.M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Skalko N., Bouwstra J., Spies F., Stuart M., Frederik P.M., Gregoriadis G.** (1998). Morphological observations on liposomes bearing covalently bound protein: studies with freeze-fracture and cryo electron microscopy and small angle X-ray scattering techniques. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1370, 151–160.
- Smith M.C., Crist R.M., Clogston J.D., McNeil S.E.** (2017). Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*, 409:5779-5787.
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V.** (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetable evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607.
- Sturm L., Ulrich N.P.** (2021). Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 6547.
- Szoka F. and Papahadjopoulos D.** (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(9):4194-4198.
- Szoka F., Olson F., Heath T., Vail W., Mayhew E., Papahadjopoulos D.** (1980). Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1–0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Vol. 601, (1980), 559–571.
- Tabatabaei F.S., Akbarzadeh A., Milani M., Zarghami N., Taheri-Anganeh M., Zeighamian V., Badrzadeh F., Rahmati-Yamchi M.** (2014). A Comparison between the cytotoxic effects of pure curcumin and

curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, Informa Healthcare USA, Inc. ISSN:2169.

Taylor T.M., Weiss J., Davidson P.M., Bruce B.D. (2005). Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:7-8, 587-605.

Tokudome Y., Saito Y., Sato F., Kikuchi M., Hinokitani T., Goto K. (2009). Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and membrane fluidity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(1), 92-96.

Trucillo P., Campardelli R., Reverchon E. (2020). Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids. *Processes*, 8(9),1022.

Turcillo P., Campardelli R., Reverchon E. (2019). A versatile supercritical assisted for the one-shot production of liposomes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 136-143.

Tüney İ., Çadırcı B.H., Ünal D., Sukatar A. (2006). Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (İzmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 30, 171-175.

Türken B. (2012). THE EFFECT OF LIPOSOME PHOSPHOLIPID CONTENT ON THE FORMATION OF TETHERED LIPID MEMBRANES. Istanbul Technical University, MSc Thesis.

Umapoorani, T., Periyannayagam, K., Indumathi, S., Balasubramanian, R., Sugithra, B., Subbulakshmi, N., & Velmurugan, R. (2016). Antimitotic activities of ulvan from *Ulva lactuca* (L) by using *Allium cepa* root tip model. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 5779-5783.

Wagner, A., & Vorauer-Uhl, K. (2011). Liposome technology for industrial purposes. *Journal of Drug Delivery*, 2011, 591325. doi: 10.1155/2011/591325.

Wagner, A., Platzgummer, M., Kreismayr, G., Quendler, H., Stiegler, G., Ferko, B., Vecera, G., Vorauer-Uhl, V., & Katinger, H. (2006). GMP production of liposomes: A new industrial approach. *Journal of Liposome Research*, 16(3), 311–319.

Webb M.S., Harasym T.O., Masin D., Bally M.B., Mayer L.D. (1995). Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *British Journal of Cancer*, 72, 896–904.

Weiss, R., Fintelmann, V. (2000). Herbal Medicine. 2. baskı, Thieme, Stuttgart.

- Wichard, T.; Charrier, B.; Mineur, F.; Bothwell, J.H.; Clerck, O.D.; Coates, J.C.** (2015). The green seaweed *Ulva*: A model system to study morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 6, 72–82.
- Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W.** (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2):163–175.
- Yaich H., Garna H., Besbes S., Paquot M., Blecker C., Attia H.** (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected from Tunisia. *Food Chemistry*, 128, 895-901.
- Yang T., Cui F.D., Choi M.K., Lin H., Chung S.J., Shim C.K., Kim D.D.** (2007) Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability, *Drug Delivery*, 14 (5) (2007) 301–308.
- Yu-Qing T., Mahmood K., Shehzadi R., Ashraf M.F.** (2016). *Ulva lactuca* and Its Polysaccharides: Food and Biomedical Aspects. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6(1), 140-151.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Esra Ak

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Pamukkale Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği.
- **Yüksek Lisans** : 2023, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı.

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Antioxidant Activity of Liposomal Formulation of Ethanol and Aqueous Extracts of *Ulva lactuca*.**
Esra Ak, Kübra Sayarım, İnci Tüney Kızılkaya, Münevver Müge Çağal (Poster Presentation). (2022). 4. Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress(EBAT), 3-6 November 2022, Antalya