



**RESVERATROL İÇEREN MİKROKÜRELERİN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Büşra SİNAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Büşra SİNAN tarafından hazırlanan “RESVERATROL İÇEREN MİKROKÜRELERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Beslenme ve Diyetetik Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

İkinci Danışman: Doç. Dr. Ilgaz AKATA

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Doç. Dr. Ebru KONDOLOT SOLAK

Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ceren HAKTANIR

İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 19/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Büşra SİNAN

19/07/2019

RESVERATROL İÇEREN MİKROKÜRELERİN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)

Büşra SİNAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Resveratrol, en fazla kırmızı üzümün kabuğunda ve çekirdeklerinde bulunan bitki kaynaklı polifenolik bir bileşiktir. Antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-kanserojen, anti-obezite ve kalp/beyin koruyucu etkileri de dâhil olmak üzere insan sağlığı üzerine çok önemli olumlu etkileri olduğu ispatlanmıştır. Bu çalışmada resveratrolün, kontrollü salım yöntemlerinden biri olan mikroküreler içerisine hapsedilme yöntemi uygulanmıştır. Resveratrolü kapsüllemek üzere sodyum aljinat (NaAlg) ve Jelatin/NaAlg blend küreleri hazırlanmıştır. Resveratrolün kapsüllemesinde, stabilite, büyüklük dağılımlarının kontrol edilebilir olması ve suda çözünen etken maddeler için yüksek yükleme kapasitesine sahip olmaları nedeni ile doğal polimerler tercih edilmiştir. Resveratrol yüklü mikrokürelerin oluşturulmasında iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılmış olup çapraz bağlayıcı olarak CaCl_2 kullanılmıştır. SEM, FTIR, DSC, XRD yöntemleri ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Ayrıca mikrokürelerin denge şişme değerleri, tutuklama değerleri ve salım profilleri incelenmiştir. Polimer oranı, çapraz bağlayıcı derişimi ve süresinin, etken madde/polimer oranının, tutuklama verimi ve resveratrolün salımı üzerine etkisi incelenmiştir. 1,2; 6,8 ve 7,4 pH değerlerinde salım çalışmaları gerçekleştirilmiş olup salım ortamının pH değeri arttıkça toplam resveratrol salımının arttığı gözlenmiştir. Etken madde/polimer oranı arttıkça mikrokürelerden resveratrol salımı NaAlg ve Jelatin/NaAlg mikrokürelerde artmış, aynı zamanda tutuklama verimi de dikkate değer ölçüde artış göstermiştir. Salım için en iyi koşulların 1/1 Jelatin/NaAlg(w/w) polimer oranı, çapraz bağlayıcı derişimi 1M; 1/2 etken madde/polimer oranı ve çapraz bağlama süresi 45 dakika olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda tutuklama verimi % 63,19, 6 saatlik salım sonucu %75,3 olarak bulunmuştur. Ayrıca, küre içine hapsedilmiş resveratrolün yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Antioksidan özelliği göz önüne alınarak antikanser özelliğinin detaylı araştırılması, ilaç olarak kullanılıp kullanılmayacağına karar verildikten sonra faz çalışmalarına başlanması önerilmektedir. Resveratrol'ün kullanımına ilişkin daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bilim Kodu : 92304
Anahtar Kelimeler : Resveratrol, mikroenkapsülasyon, kontrollü salım, mikroküre
Sayfa Adedi : 90
Danışman : Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP
İkinci Danışman : Doç. Dr. Ilgaz AKATA

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF RESVERATROL LOADED MICROSPHERES

(M. Sc. Thesis)

Büşra SİNAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Resveratrol is a plant-derived polyphenolic compound found mostly in the skin and seed of red grapes. Resveratrol has been reported to have various benefits for human health, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-obesity, and heart/brain protective effects. In this study, encapsulation of resveratrol into microspheres, which is one of the controlled release methods, have been applied. Microbeads of sodium alginate (NaAlg) and gelatine/sodium alginate blend microbeads were prepared to encapsulate resveratrol. Natural polymers have been preferred in the encapsulation of resveratrol because of stability, size distributions being controllable and high loading capacity for water-soluble active substances. Ionotropic gelation method was used in the formation of resveratrol-loaded microbeads. CaCl_2 was used as a crosslinking agent. The prepared microbeads were characterized by scanning electron microscopy (SEM), fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and X-Ray diffraction (XRD). Antioxidant capacity was determined by DPPH method. Furthermore, microbeads were characterized by equilibrium swelling values, entrapment efficiency values and release profiles. The release studies were carried out at respectively 1,2; 6,8 and 7,4 pH values and it was observed that as the pH of the medium increased cumulative drug release increased. Resveratrol release from the microspheres increased in both NaAlg and gelatin / NaAlg microspheres as the drug / polymer ratio increased. Meanwhile, the entrapment efficiency also increased considerably. Optimum conditions for the preparation and release of the microspheres were determined as Gelatine/NaAlg (w/w):1/1, CaCl_2 crosslinker concentration:1 M, drug/polymer ratio (w/w):1/2, crosslinking time:45 minutes. The cumulative release at these conditions was found to be 75,3 % at the end of 6 hours and entrapment efficiency was found to be 63,19%.Also, antioxidant activity observed by DPPH method, resveratrol loaded microspheres showed higher antioxidant activity. It is recommended to investigate the anticancer feature in detail and to start phase I studies. Further studies are needed for resveratrol.

Science Code : 92304

Key Words : Resveratrol,microencapsulation, controlled drug release, microspheres

Page Number : 90

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ilgaz AKATA

TEŞEKKÜR

Çalışmanın kurgusundan, verilerin derlenmesine kadar her aşamada engin bilgi ve tecrübesiyle değerli katkılarını esirgemeyen özverili ve sabırlı tutumuyla her daim yol gösterici olan tez danışmanım Doç. Dr. A.Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP'e, deneysel çalışmalarım boyunca benden yardım, bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana yol gösteren ve yönlendiren kendisinden çok şey öğrendiğim saygı değer hocam Doç. Dr. Ebru KONDOLOT SOLAK' a, tez çalışmam kapsamında desteklerini esirgemeyen ikinci danışmanım Doç.Dr. Ilgaz AKATA'ya, çalışma sürecinde bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan Dr. Hasya Nazlı EKİN'e, Laboratuvar çalışmalarına desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Didem DELİORMAN ORHAN'a ve laboratuvar arkadaşlarım Seçil AKGÜL KAYA ve Ali ÖZTÜRK'e, küre karakterizasyon çalışmalarımın tamamlanabilmesi için analiz yapma imkânı bulduğum ODTÜ Merkez Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına, tez yazımı sırasında manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan mesai arkadaşlarıma, hayatımın her aşamasında olduğu gibi, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren kıymetli aileme, en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antioksidanlar	3
2.1.1. Polifenoller	5
2.1.2. Resveratrol	7
2.1.3. Resveratrolün sağlık üzerine etkileri.....	12
2.1.4. Literatürde yer alan resveratrol çalışmaları.....	16
2.2. Antioksidan Aktivite Tayini.....	18
2.2.1. DPPH (1,1-difenil -2-pikrilhidrazil) radikal temizleme aktivitesi tayini ..	20
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	20
2.3.1. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırması.....	22
2.4. Mikroküreler ve Mikroenkapsülasyon	27
2.4.1. Mikroküreler	27
2.4.2. Mikroenkapsülasyon teknolojisi	29
2.4.3. Mikroenkapsülasyon üretim teknolojisinde kullanılan yöntemler.....	29
2.4.4. Mikroküre hazırlanmasında kullanılan polimerler.....	33
2.5. Çalışma Kapsamında Kullanılan Destek Materyalleri	35
2.5.1. Sodyum aljinat	35

	Sayfa
2.5.2. Jelatin	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	39
3.1.2. Kullanılan cihazlar	39
3.2. Yöntem.....	40
3.2.1. Resveratrolü HPLC ile saptama yöntemi.....	40
3.2.2. Resveratrol kalibrasyon eğrisinin çıkarılması.....	42
3.2.3. Resveratrol yüklü mikrokürelerin hazırlanması.....	43
3.2.4. Resveratrol yüklü mikrokürelerden salım çalışmaları	46
3.2.5. Mikrokürelerin denge su içeriklerinin tayini.....	47
3.2.6. Tutuklama verimi (TV) tayini.....	47
3.2.7. Karakterizasyon çalışmaları	48
3.2.8. Antioksidan aktivite tayini	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	51
4.1. Resveratrolün Jelatin/NaAlg Mikrokürelerden Kontrollü Salımı	51
4.1.1. Çapraz bağlayıcı derişiminin resveratrol salımı üzerine etkisi.....	51
4.1.2. Jelatin/NaAlg çapraz bağlama süresinin ve pH'nın resveratrol salımı üzerine etkisi.....	52
4.1.3. Jelatin/NaAlg mikrokürelerde polimer/polimer oranı değişiminin salım üzerine etkisi.....	53
4.1.4. Jelatin/NaAlg mikrokürelerde etken madde/polimer oranı değişiminin salım üzerine etkisi.....	54
4.1.5. NaAlg ve blend mikrokürelerde çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisi	55
4.2. Boş Mikrokürelerin Denge Şişme Değerleri.....	56
4.3. Farklı Formülasyonlarda Hazırlanan Mikrokürelerin Tutuklama Verimleri ve Mikroküre Verimleri	58

	Sayfa
4.4. Mikrokürelerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramları	59
4.5. Mikrokürelerinin FTIR spektrumları	61
4.6. Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikrograf (SEM) Görüntüleri.....	63
4.7. Mikrokürelerin X-Işını Kırınımı Eğrileri	66
4.8. Mikrokürelerin Antioksidan Aktiviteleri	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	75
EKLER.....	87
EK-1.....	88
EK-2.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Literatürde yer alan resveratrol yüklü mikro/nano partikül çalışmaları	18
Çizelge 2.2. Mikroenkapsülasyon yöntemleri	30
Çizelge 2.3. Biyolojik olarak çözünebilen polimerler	34
Çizelge 2.4. Biyobozunur olmayan polimerler	35
Çizelge 2.5. Doğal ve sentetik polimerlerin avantajları ve dezavantajları	35
Çizelge 3.1. Resveratrolün miktar tayini için kullanılan HPLC analiz yöntemi	41
Çizelge 3.2. Resveratrol yüklü mikrokürelerin hazırlanma koşulları	45
Çizelge 3.3. Boş mikrokürelerin hazırlanma koşulları	46
Çizelge 4.1. Boş mikrokürelerin denge şişme değerleri (%)	57
Çizelge 4.2. Farklı formülasyonlarda hazırlanan mikrokürelerin tutuklama verimleri ve mikroküre verimleri	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması	4
Şekil 2.2. Bazı polifenollerin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.3. Polifenol tüketiminin faydaları	6
Şekil 2.4. Bitkilerde resveratrol sentezi	9
Şekil 2.5. Resveratrolün kimyasal yapısı	10
Şekil 2.6. Ksenobiyotiklerin gastrointestinal sistemden geçişi ve çeşitli faktörler.....	12
Şekil 2.7. Resveratrol molekülünün sağlık üzerine etkileri	13
Şekil 2.8. DPPH radikalinin formülü	20
Şekil 2.9. Kan serumundaki ilacın alışılmış dozaj şekilleri ve kontrollü salım şekli	21
Şekil 2.10. Difüzyon kontrollü sistemlerin şematik görünümü	24
Şekil 2.11. Mikroküre morfolojisi	28
Şekil 2.12. İyonotropik jelasyon yöntemi	32
Şekil 2.13. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı	36
Şekil 2.14. Sodyum aljinatın Ca^{2+} ile çapraz bağlanması sonucu oluşan egg-box modeli	36
Şekil 2.15. Jelatinin kimyasal yapısı	37
Şekil 2.16. NaAlg-Jelatin interaksyonu	38
Şekil 2.17. Sodyum aljinatın Ca^{2+} iyonu ile çapraz bağlanma yapısı	38
Şekil 3.1. Standart resveratrol HPLC kromatogramı	41
Şekil 3.2. Resveratrol (<i>Polygonum cuspidatum</i>) HPLC kromatogramı	42
Şekil 3.3. Resveratrol kalibrasyon grafiği (UV vis-spektrofotometre).....	42
Şekil 3.4. Mikroküre hazırlama sistemi	44
Şekil 4.1. NaAlg mikrokürelerde çapraz bağlayıcı derişiminin resveratrol salımı üzerine etkisi	52

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Jelatin/ NaAlg mikrokürelerde çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.3. Jelatin/ NaAlg mikrokürelerde polimer/polimer oranının salım üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.4. Jelatin/ NaAlg mikrokürelerde etken madde/polimer oranının salım üzerine etkisi	55
Şekil 4.5. NaAlg ve Jelatin/ NaAlg mikrokürelerinden kümülatif salım profili.....	56
Şekil 4.6. Optimum koşulların sağlandığı mikrokürelerin denge şişme değerleri (%)...	57
Şekil 4.7. Resveratrol, dolu ve boş mikrokürelerin DSC termogramları.....	60
Şekil 4.8. Resveratrol, NaAlg, jelatin ve mikrokürelerin FTIR spektrumları.....	62
Şekil 4.9. Dolu mikrokürelerin ve Resveratrolün XRD spektrumları	66
Şekil 4.10. Boş mikrokürelerin XRD spektrumları	67
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan resveratrolün, DPPH radikal temizleme aktivitesi yüzdelere göre 517 nm’de verdiği grafik	68
Şekil 4.12. Resveratrolün DPPH radikal temizleme (antioksidan) aktivitesi	69

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Resveratrolün bitki kaynakları	8
Resim 4.1. Mikrokürelerin SEM görüntüleri	65



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μm	Mikrometre
mL	Mililitre
mg	Miligram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

Kısaltmalar

Açıklamalar

DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FTIR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
M	Molar
NaAlg	Sodyum aljinat
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
UV	Ultraviole
XRD	X-Ray Diffraction (X-Işınları Difraksiyonu)

1. GİRİŞ

Son yıllarda, toplumda sağlıklı ve kaliteli yaşam unsurlarına yönelik farkındalığın oluşması ile birlikte terapötik ve profilaktik doğal ürünlere olan talep de artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre ilaçların % 25'i tıbbi bitkilerden üretilmektedir (Sahoo, Manchikanti ve Dey, 2010). Tıbbi bitkiler içerdikleri çeşitli bileşenler nedeniyle farmasötik ve tıbbi alanlarda potansiyel kaynak olarak kullanılabilirler. Bu bileşenlerden biri olan fenolik bileşikler, bitkiler âleminde yer alan en geniş kimyasal gruplardan birini oluşturmaktadır.

Fenolik bileşikler içinde yer alan polifenoller, insan sağlığı üzerindeki potansiyel yararları nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, polifenollerin birçok hastalık için olası bir tedavi seçeneği sunduğunu göstermektedir. Polifenollerin mevcut kimyasal ilaçlardan daha az yan etkiye sahip olması da önemli bir avantaj sunmaktadır. Bu nedenle, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan fenolik bileşiklerin miktarı her geçen yıl artmaktadır (Mohan, Narayanan, Sethuraman ve Krishnan, 2013).

Antioksidan özelliklere sahip olan polifenoller kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Vladimir-kneževi, Blažekovi, Stefan ve Babac, 2012). Bu grup içerisinde yer alan resveratrol ise ilaç ve tıp alanında yapılan araştırmalarda etki alanı geniş bir polifenolik aktif bileşik olarak öne çıkmıştır. Ancak polifenolik bileşiklerin kararsız ve kolayca okside olabilir olması, ısı ve ışığa karşı duyarlı olması uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu nedenle bu bileşikleri aktif moleküler formda tutabilen koruyucu mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Chen, Remondetto ve Subirade, 2006).

Yapılan araştırmalar sonucu kapsülleme teknolojisinin, biyoaktif bileşenleri korumak ve gelişmiş özelliklere sahip yeni formülasyonlar geliştirmek için potansiyel bir yöntem olduğuna gösterilmiştir. Mikroenkapsülasyon teknolojisinin çekirdek malzemeyi bozulmaya karşı korumak, istenilen süre zarfında sabit oranda yavaşça salımını sağlamak, istenmeyen lezzeti veya tadı önlemek gibi birçok avantaj sağlayarak var olan sınırlamalarının üstesinden gelmek için kullanılabilecek etkin bir teknoloji olduğu yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir (Jeyakumari, Zynudheen ve Parvathy, 2016). Bunun yanı sıra bu teknolojinin temel avantajı

bileşiklerin salımını kontrol etme yeteneğidir. Söz konusu salım mekanizmaları, kontrollü ilaç salım sistemleri olarak adlandırılmaktadır.

Kontrollü salım insan sağlığının iyileştirilmesi ve geliştirilmesine katkıda bulunan, multidisipliner bir bilimsel yaklaşım sunan bilimin önde gelen alanlarından birini temsil etmektedir. Bu sistemler geleneksel dozaj formlarına kıyasla geliştirilmiş etkinlik, azaltılmış toksisite, gelişmiş hasta uyumu ve rahatlığı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Nano ve mikrotasıyıcı sistemler ilaç salım teknolojilerinde kullanılan en gözde teknolojidir (Singh, Hemant, Ram ve Shiva, 2010). Araştırmalar etken maddenin mikro/nanotasıyıcılar içine hapsedilmesinin gelişmiş ilaç çözünürlüğü, kontrollü ilaç salımı, gelişmiş biyoyararlanım, artan stabilite ve uzun süreli saklama koşullarına olumlu yönde etkisi olduğunu göstermektedir (Aggarwal ve diğerleri, 2004).

Bu tez çalışmasında, polifenolik bir bileşik olan resveratrol Jelatin/NaAlg blend mikroküreler içine enkapsüle edilmiştir ve salım çalışmaları yapılmıştır. Resveratrolün mikroküre içine enkapsüle edilmesi, bileşiğin zayıf yönleri olan suda çözünürlüğünü, kimyasal stabilitesini ve biyoyararlanımını geliştirmek için uygulanmaktadır. Çalışma kapsamında, iyonotropik jelasyon yöntemi ile resveratrolün sodyum aljinat (NaAlg)/ Jelatin polimerleri içine hapsedilmesiyle oluşturulan mikroküreler aracılığıyla farklı pH'larda (mide, bağırsak giriş ve bağırsak çıkış) salımı çalışılmıştır. Çalışmada NaAlg / Jelatinin kalsiyum klorür ile çapraz bağlanması sağlanmıştır. Ayrıca mikrokürelerin denge şişme değerleri, tutuklama değerleri ve salım profilleri incelenmiştir. Polimer oranının, çapraz bağlayıcı derişimi ve süresinin, etken madde/polimer oranının, tutuklama verimi ve resveratrolün salımı üzerine etkisi incelenmiştir. SEM, FTIR, DSC, XRD yöntemleri ile karakterizasyon çalışmaları, DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite tayini yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerini nötralize ederek ROS'ların neden oldukları olumsuz süreçleri ve bir dizi hastalığı engelleyen moleküllerdir. Antioksidanlar, vücut tarafından üretilen bir savunma mekanizması olduğu gibi gıdalarla da alınabilmektedirler. ROS reaktivliklerine ve oksitlenme yeteneklerine bağlı olarak serbest radikaller dâhil olmak üzere tüm yüksek oranda reaktif oksijen içeren molekülleri kapsayan bir terimdir (Kumar, 2014). ROS tipleri hidroksil radikalini, süperoksit anyon radikalini, hidrojen peroksit, singlet oksijeni, nitrik oksit radikalini, hipoklorit radikalini ve çeşitli lipid peroksitlerini içerir. Hepsi membran lipidleri, nükleik asitler, proteinler ve enzimler ve diğer küçük moleküller ile reaksiyona girerek hücrel hasara yol açabilmektedir (Badarinath ve diğerleri, 2010).

Biyomolekülleri ROS'un zararlı etkilerinden korumak için antioksidanlar kullanılır. Oksidasyon reaksiyonları, sonunda hücreye zarar veren veya ölümüne neden olan çoklu zincir reaksiyonlarını başlatabilen serbest radikalleri üretir. Antioksidanlar, bu serbest radikal ara ürünlerini, kendilerini okside ederek uzaklaştırır ve diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder, böylece zararlı zincir reaksiyonlarını durdurur. Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyon sürecini inhibe edebilir ve bu nedenle vücutta farklı fizyolojik role sahiptirler (Young ve Woodside, 2001).

Dolayısıyla, hastalıkları önleyici özelliğinin yanı sıra daha kaliteli bir yaşam için antioksidanlar insan sağlığı için temeldir. İnsan sağlığını etkileyen kardiyovasküler hastalıklar, dejeneratif hastalıklar, yaşlanma, karaciğer hasarı, katarakt, ateroskleroz ve kanser gibi başlıca hastalıkların çoğu oksidatif süreçle ilişkilidir. Antioksidanlar, hücre hasarını sınırlandırarak bu hastalıkları önleyebilmektedir (Knight, 2000).

Son birkaç yıldır araştırmalar, antioksidanların doza ve biyoyararlanıma bağlı olarak insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olabileceğini de göstermiştir. Bu nedenle, terapötik potansiyellerinden tam olarak yararlanmak için insan sağlığının geliştirilmesinde antioksidanların faydasını doğrulamak gerekir (Shebis, Iluz , Kinel-Tahan, Dubinsky ve Yehoshua, 2013).

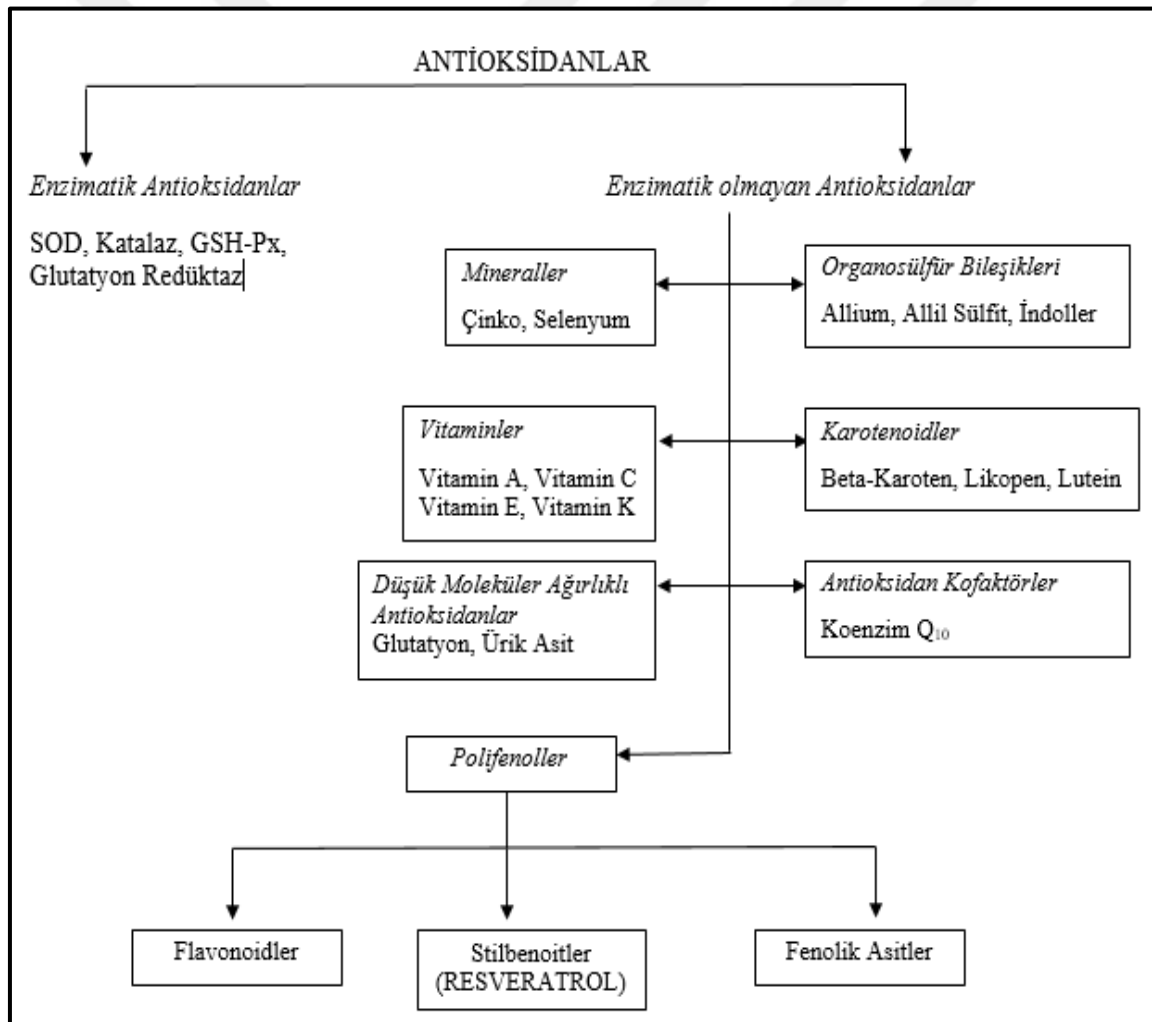
Canlı hücrelerde iki ana antioksidan grubu vardır.

1)Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon redüktazı.

2)Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidan kaynakları C vitamini, E vitamini, selenyum, çinko, beta karoten, karoten, taurin ve glutatyondan oluşmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar, doğal besin kaynaklarından elde edilebilmekte olup bu grupta en yaygın olarak görülen ise polifenol grubudur (Agarwal, Gupta ve Sekhon , 2008).



Şekil 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması (Agarwal ve diğerleri, 2008).

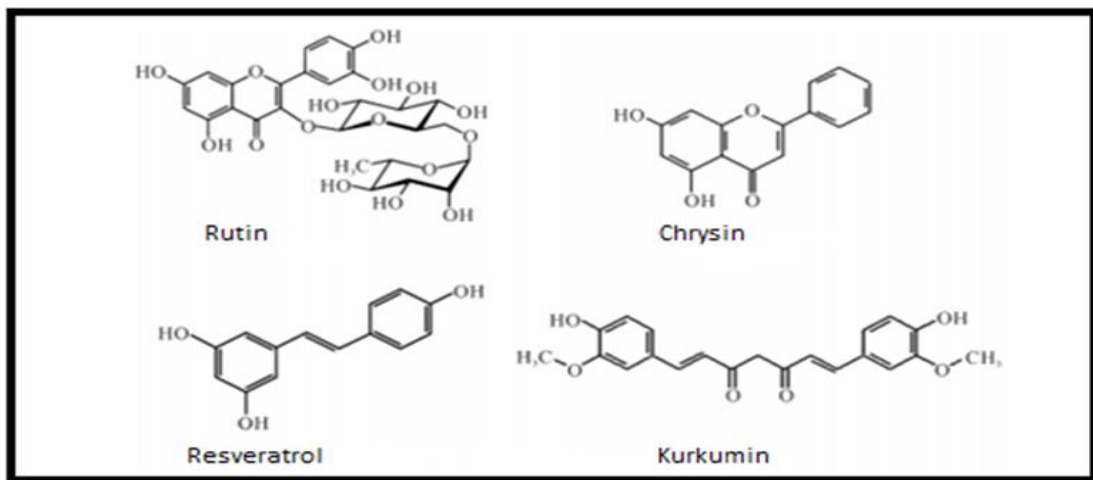
Antioksidanların polimerik mikro/nanopartiküller içinde kapsüllenmesi, bu bileşenlerin biyoyararlanımını arttırmada umut vadetmektedir. Mikro/nanopartiküller, salım sırasında

biyoaktif bileşenin minimum düzeyde bozulması ile antioksidan spesifik etki bölgesine ulaştırmak için tasarlanabilmektedir. Antioksidanlar, polimerin bozunma profilini kontrol ederek, uygun polimer seçilerek ve hücre ortamı (örneğin sıcaklık, pH, enzimler, iyonik kuvvet) sağlanarak kontrollü bir şekilde salınabilmektedir (Garti, 2008).

2.1.1. Polifenoller

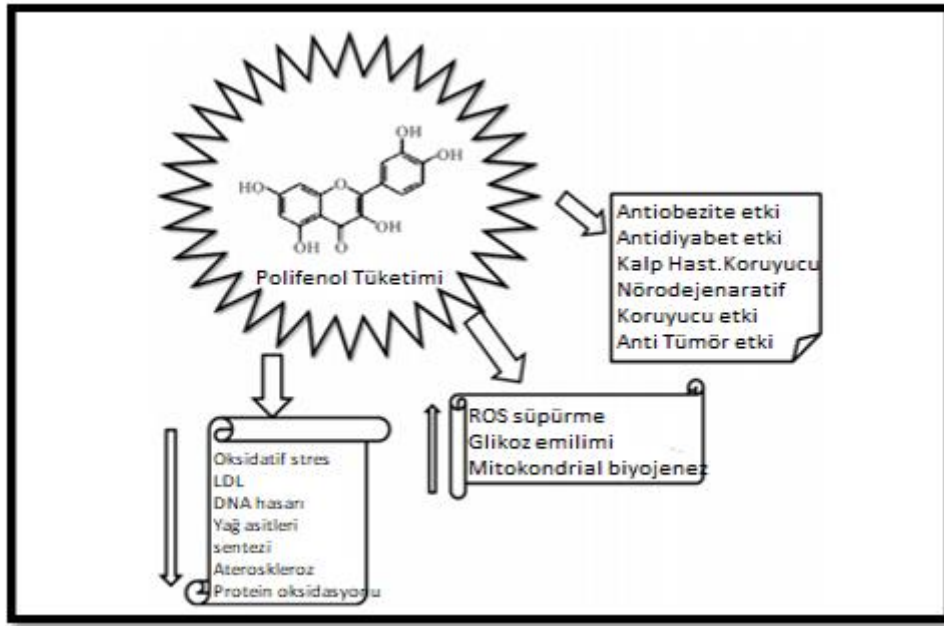
Fenolik bileşikler, bitkiler aleminde yer alan en geniş kimyasal gruplardan birini oluşturmaktadır. 8000'den fazla bileşiğin izole edildiği ve tanımlandığı tahmin edilmektedir (Syngletary, Jackson ve Milner, 2005). Polifenoller, ortak yapıya sahip olan polihidroksillenmiş fitokimyasallardır. Bir veya daha fazla fenol kısmı bulunan bitki kaynaklı fitokimyasal bileşiklerin, ciddi hastalıklara karşı çok çeşitli terapötik potansiyeller ürettiği bilinmektedir (Rein ve diğerleri, 2012). Flavonoidler, fenolik asitler ve stilbenoitler olmak üzere üç ana alt sınıfa bölünmektedirler. Bugüne kadar izole edilmiş bileşiklerin çoğu flavonoidlerin alt sınıfına aittir.

Fenolik asitler genellikle iki ana gruba ayrılmaktadır. Yedi karbon atomu içeren benzoik asitlerden veya dokuz karbon atomu içeren sinamik asitlerden elde edilmektedirler (Duthie, Duthie ve Kyle, 2000). Bütün bu bileşikler hidroksiledir. İzole edilmiş ana bileşiklere gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve gentisik asit örnek verilebilir. Stilbenoitlerin alt sınıfı ise polihidroksile stilbenlerdir, ana temsilcisi resveratrol'dür (Ozcan ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.2. Bazı polifenollerin kimyasal yapısı (Harbone ve Williams, 2000).

Polifenoller, serbest radikallerin elimine edilmesi, diğer antioksidanların (örn. E vitamini) korunması ve yenilenmesi ile prooksidan metallerin şelasyonu dâhil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla sağlık yararları sağlamaktadır. İnsan fizyolojisi açısından bakıldığında, polifenoller yaşlanma karşıtı, anti-enflamatuvar, anti-oksidan ve anti-proliferatif etkiler gibi vücudun savunma tepkilerinde hayati öneme sahiptir. Bu nedenle, oksidatif stresin yönetimi ile diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı kronik hastalıkların insidansını azaltacak yüksek antioksidan bileşik içeriğine sahip bu tür bitkisel besinleri gıda olarak tüketmek oldukça sağlıklıdır. Ayrıca, polifenoller insan diyetlerinde en bol bulunan antioksidanlardır. Çok sayıda çalışma, insan sağlığı üzerinde koruyucu etkileri olduğunu ve sağlıklı ve dengeli bir diyetin kilit bileşenleri olduğunu doğrulamaktadır (Lima ve diğerleri, 2014).



Şekil 2.3. Polifenol tüketiminin faydaları (Lima ve diğerleri, 2014).

Stilbenler

Stilbenler, yapısal olarak, aromatik halkalar üzerinde hidroksil grupları taşıyan 1,2-difeniletilen çekirdeğinin varlığı ile karakterize edilmektedir. Monomerler veya oligomerler şeklinde bulunmaktadır. En iyi bilinen bileşik, bir trihidroksistilben iskeletine sahip olan trans-resveratroidir (Del Rio ve diğerleri, 2012; King ve Young, 1999). Stilbenlerin ana kaynakları üzüm, şarap, soya, yerfıstığı ve yerfıstığı türevleridir (Halliwell, 2002).

Fenolik bileşiklerin biyoyararlanımı

Belirli bir fenolik bileşiğin hedeflenen dokuya potansiyel terapötik etkileri, bileşiğin biyolojik aktivitesini değiştirebilecek fiziksel yapısında meydana gelen biyotransformasyonun derecesine bağlıdır (Ruotolo ve diğerleri, 2014).

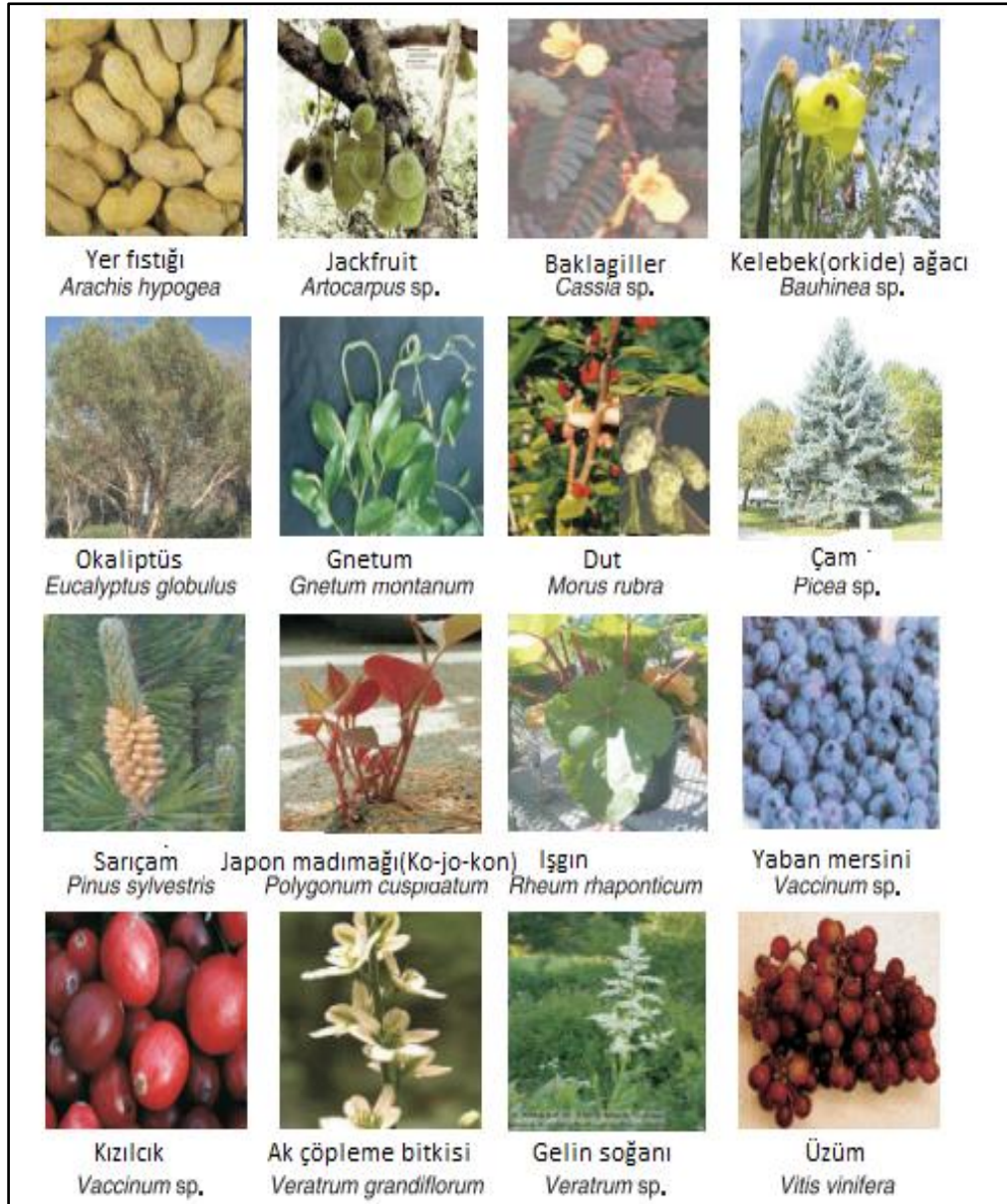
Fenolik bileşiklerin biyoyararlanımının artırılması, hedeflenen dokulardaki kronik hastalıklara karşı terapötik etkisinin iyileştirilmesinde çok önemli bir role sahiptir (Spigoni ve diğerleri, 2017). Ancak, polifenolik bileşikler, oksijene, ışığa ve ısıya karşı çok duyarlıdır. Bu problemler enkapsülasyon yöntemi ile çözümlenebilmektedir. Kapsülleme, bileşiklerin bozulmadan, oksidasyondan korunması için etkili bir yöntemdir. Bu nedenle fenolik bileşiklerin biyoyararlanımını arttırmak için nanopartiküller ve mikro taşıyıcı sistemler kullanılarak kimyasal ve teknolojik modifikasyon yöntemleri gibi birçok yöntem geliştirilmiştir (Tsume, Incecayir, Song , Hilfinger ve Amidon, 2014). Biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımının artırılmasında kullanılan nano/mikro enkapsülasyon teknolojisinde polimerler, kitosan, dendrimerler ve siklodekstrinler kullanılan yaygın malzemeler arasındadır. Nanoteknoloji, hedef dokularda fenolik biyoyararlanım geliştirilmesinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Nano/mikro sistemlerin kullanılması fenolik bileşiklerin, metabolik biyotransformasyonu önleyerek fiziksel yapılarını kaybetmeden hedef dokulara ulaşmalarına aracılık etmektedir (Rosas ve diğerleri, 2017).

Son yıllarda enkapsülasyon teknolojisi fenolik bileşiklerin emilimini ve biyoyararlanımını arttırmak için potansiyel bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta ve çalışmalar yapılmaktadır (Munin ve Levy, 2011).

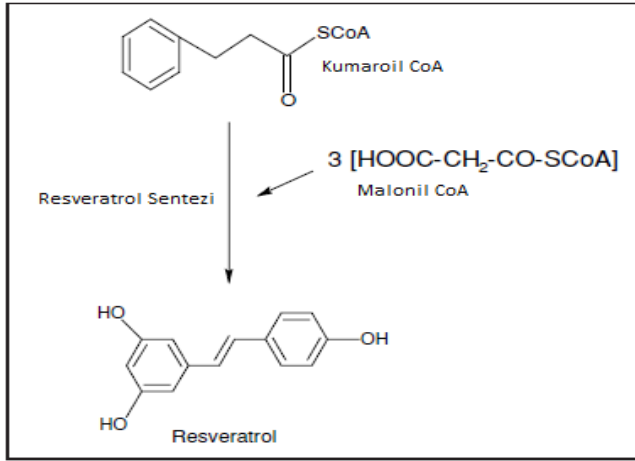
2.1.2. Resveratrol

Resveratrol (trans-resveratrol; trans-3,5,40-trihidroksi-stilben), molekül yapısı bakımından bir metilen köprüsü ile birleşmiş 2 aromatik halkadan oluşan, stilben ailesinden bir bileşiktir. Resveratrol ilk olarak 1940 yılında akçöpleme bitkisinin (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) köklerinde bulunan bir bileşen olarak tanımlanmıştır (Takaoka, 1939). Daha sonra geleneksel Çin ve Japon tıbbında kullanılan Japonca'da Ko-jo-kon olarak adlandırılan kurutulmuş Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum* Sieb.&Zucc.) köklerinde bulunmuştur (Vastano ve diğerleri, 2000). Bitkiler aleminde 30'dan fazla stilben ve stilben glikoziti

tanımlanmıştır (Soleas, Diamandis ve Goldberg , 1997). Resveratrol, en az 72 bitki türünde bulunmaktadır ve 3 molekül malonil CoA molekülü ile 1 molekül 4-kumaril CoA molekülü arasında yoğunlaşma reaksiyonu ile oluşmaktadır (Dercks ve Creasy , 1989; Soleas, Diamandis ve Goldberg , 1997). Bileşik, *Polygonum cuspidatum*, okaliptüs ve ladin gibi ağaçlarda çokça bulunmaktadır. Ancak, yenilebilir bitkilerde nadir görülmektedir. Birincil diyet kaynakları yerfıstığı, yerfıstığı yağı, üzüm ve şaraptır (Hillis, Hart ve Yazaki , 1974).



Resim 2.1. Resveratrolün bitki kaynakları (Aggarwal ve Shishodia, 2006)

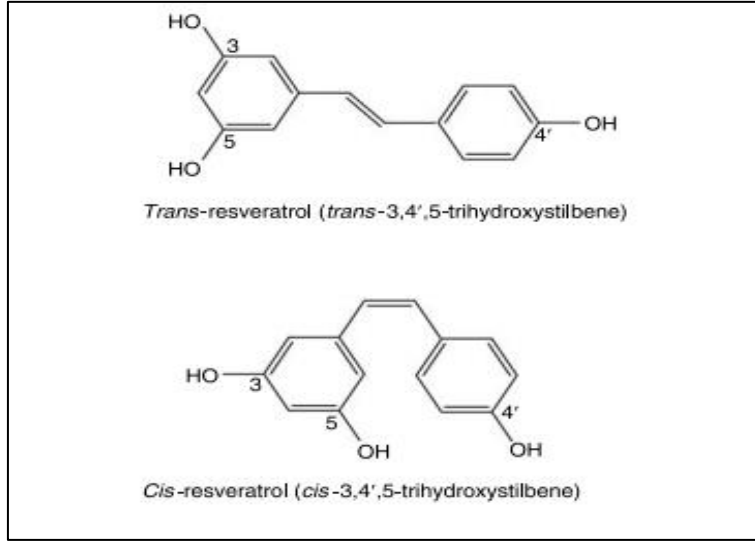


Şekil 2.4. Bitkilerde resveratrol sentezi (King, Bomser ve Min, 2006)

1976 yılında üzüm şarabında (*Vitis vinifera*) resveratrole rastlanmış olup üzümün kabuğunda yoğun bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca üzüm çeşidinin resveratrol konsantrasyonunu da etkilediği, kırmızı üzüm çeşitlerinde beyaz üzüm çeşitlerine kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu keşfedilmiştir (Sieman ve Creasy, 1992). Taze üzüm kabuklarında bulunan resveratrol miktarı gram başına 50 ile 100 µg aralığındadır. Şaraptaki konsantrasyonu ise litre başına 0,2 ila 7,7 mg arasında değişkenlik göstermektedir.

Resveratrolün yapısı

Resveratrol moleküler formülü $C_{14}H_{12}O_3$, 253- 255 °C arasında erime noktasına sahip, molekül ağırlığı 228.25 g / mol olan kirli beyaz bir tozdur. Resveratrol, cis ve trans olmak üzere 2 yapısal izomerik formda bulunur, trans formu daha yaygındır ve biyolojik olarak aktiftir (Aggarwal ve Shishodia, 2006).



Şekil 2.5. Resveratrolün kimyasal yapısı (Aggarwal ve Shishodia, 2006)

Bileşik, ısıya veya ultraviyole ışına maruz kaldığında cis- formuna dönüşmektedir. Bileşiğin karakteristik özelliği, bitkilerde doğal olarak oluşan bir fenol olmasıdır ve antioksidan özelliklere sahip olmasıdır. Ekstre edildiğinde, resveratrolün suda çözünürlüğü düşüktür. Resveratrol antioksidan aktiviteye sahip olduğundan oksidasyonu inhibe edebilmekte ve hücrelere zarar verebilecek serbest radikalleri süpürebilmektedir. Oksijene temas, normal oda koşulları, ışık ve ısı, bileşiğin bütünlüğünü ve saflığını değiştirmektedir (Baur ve Sinclair , 2006).

Son on yıldır, resveratrol ve analoglarının varlığını ve miktar tayinini yapmak için HPLC ve gaz kromatografisi (GC) gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Resveratrolün eldesi oldukça kısıtlıdır. Bir kg kuru üzüm kabuğundan 92 mg resveratrol elde edilebilmektedir (Aggarwal ve Shishodia, 2006).

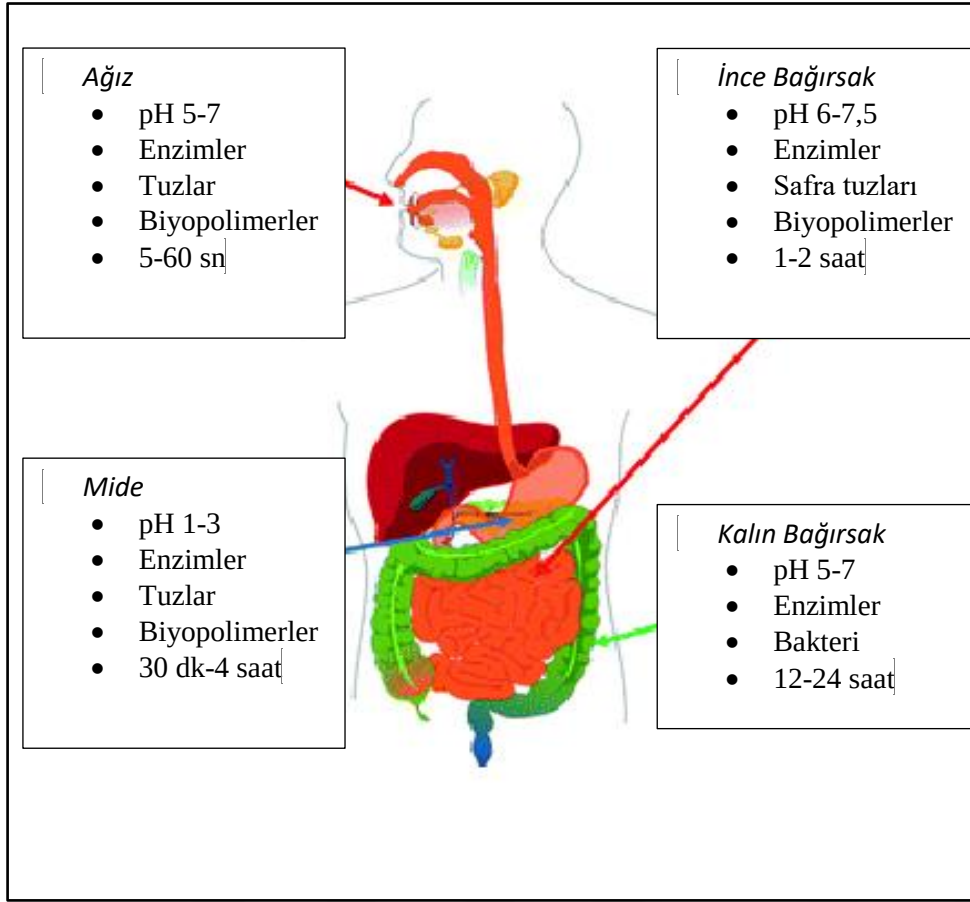
Bitkiler aleminde bir antibiyotik olarak da kabul edilen resveratrol'ün, enfeksiyon ve yaralanmaya karşı vücudun savunma mekanizmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Lu ve Serrero, 1999). Ayrıca, insan vücudunda birçok faydalı fizyolojik aktiviteye sahiptir. Enflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı ve otoimmün hastalıklar dâhil olmak üzere pek çok hastalığın önlenmesinde önemli role sahiptir. Ayrıca, resveratrol, antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteler göstermekte olup bu nedenle bahsi geçen hastalıkların tedavisinde potansiyel bir araç olarak öne çıkmaktadır (Shi ve diğerleri, 2004).

Resveratrolün metabolizması

Resveratrolün sindirimi, ağız yoluyla alındığında, alt gastrointestinal sistemde (bağırsakların epitel hücreleri) gerçekleşir. 2004 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar resveratrolü intravenöz ve oral olarak test etmiş ve biyoyararlanımının düşük olduğunu, ancak ilacın dolaşım hızının yüksek olduğunu kanıtlamışlardır. Oral yoldan alınan 25 mg resveratrolün en az %70'i bağırsaklardan hızlı bir şekilde absorbe edilmiştir. Oral yoldan alındığında günde 20-50 mg arasında alınması gerektiği vurgulanmıştır (Walle, Hsieh, DeLegge ve Oatis , 2004). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, resveratrolün iyi tolere edildiği ve advers etkilere oldukça nadir rastalandığı gösterilmiştir (Pannu ve Bhatnagar, 2019). Ancak dozun 5 gram üzerine çıktığında toksik olduğu belirtilmiştir. Yüksek dozda resveratrol (2,5 ve 5 g) hafif ve orta şiddette gastrointestinal semptomlarla ilişkilendirilmiştir (Sergides ve diğerleri, 2016). Resveratrolün plazma yarılanma ömrünün 9.2 ± 0.6 h olduğu belirlenmiştir (Walle, Hsieh, DeLegge ve Oatis , 2004).

Resveratrol oral yolla alındıktan bir süre sonra karaciğer ve bağırsak epitel hücrelerinde hızla glukuronid ve sülfat konjugatlarına dönüşmekte ve metabolize olmaktadır. *In vivo* yapılan çalışmalar neticesinde plazmada resveratrolün en önemli metabolitinin sülfat olduğu sonucuna varılmıştır (Walle, 2011). Bileşiğin hızlı metabolizma olma özelliğini yavaşlatmak ve terapötik etkisini geliştirmek için polimerik mikro/nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcı sistemlerinden faydalanılmaktadır.

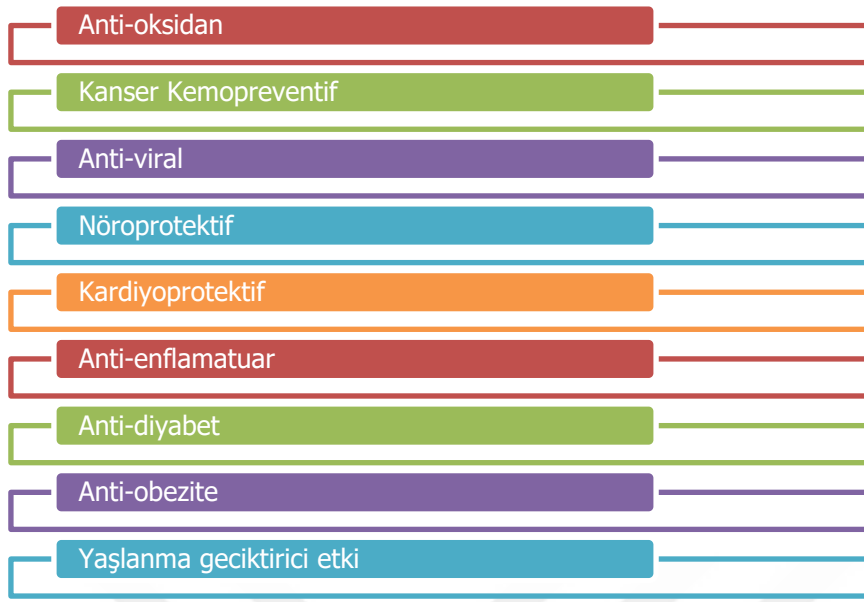
İnsanlarda resveratrol, ister glikol ister glikosidik formda olsun, oral tüketimden sonra oldukça hızlı bir şekilde emilmektedir. Hem plazma hem de idrardaki resveratrol seviyeleri, kolayca tespit edilebilmektedir ve en yüksek plazma konsantrasyonları, alımdan yaklaşık 30-60 dakika sonra elde edilmektedir. Oral uygulamadan sonra, plazma ve serumdaki serbest resveratrol miktarı, toplam resveratrol miktarının % 2'sinden daha azını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, sülfat ve glukuronid konjugatları meydana gelmektedir (Wenzel, 2005). Resveratrolün vücuttan atılımı idrarla ve feçes ile sağlanmaktadır (Neves, Lucio, Lima ve Reis, 2012).



Şekil 2.6. Ksenobiyotiklerin gastrointestinal sistemden geçişi ve çeşitli faktörler (Le, Lovalenti ve Abdul-Fattah, 2015)

2.1.3. Resveratrolün sağlık üzerine etkileri

In vitro ve *in vivo* çalışmalar, resveratrolün anti-kanserojenik, anti-enflamatuvar, anti-obezite ve kalp / beyin koruyucu etkileri de dahil olmak üzere bir dizi potansiyel sağlık faydasına sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, gıdalar ve farmasötik ürünlerde resveratrolün biyoaktif bir ajan olarak kullanılmasına büyük ilgi duyulmaktadır (Brown ve diğerleri, 2009). Ayrıca resveratrol, miyokard enfarktüsü, aritmi hipertansiyon, hipertrofi, fibroz, ateroskleroz ve trombozu inhibe ederek koroner kalp hastalığına karşı mücadeleye de yardımcı olabilmektedir (Brown ve diğerleri, 2009). Resveratrol içeren gıdaların artan tüketiminin ana sebeplerinden birinin sağlık üzerindeki olumlu faydaları ile ilişkili olduğu öngörülmektedir (King, Bomser ve Min, 2006).



Şekil 2.7. Resveratrol molekülünün sağlık üzerine etkileri

Anti-oksidan etkisi

Bir antioksidan olarak resveratrol, oksidatif stres kaynaklı hücresel hasarı ve hastalıkların oluşumunu önleyebilmekte veya geciktirebilmektedir. Oksidatif stresin neden olduğu aşırı hasar, hücrelerin apoptoza uğramasına neden olabilir. Resveratrol'ün, İsviçre 3T3 fare fibroblastları, sıçan feokromositoma (PC12), insan periferik kan mononükleer (PBM) ve insan retinal pigment epitel (RPE) hücreleri (Jang ve Surh , 2001) dahil olmak üzere çeşitli hücre hatlarında oksidatif kaynaklı apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Losa, 2003). Ayrıca resveratrol antioksidan aktivitesi ile ilişkili olarak aterosklerozun (damar sertliği) ilerlemesine karşı da koruma sağlayabilmektedir (Frémont , Belguendouz ve Delpal , 1999).

Son olarak 2019 yılında Alamo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, özellikle sigara içen erkeklerde görülen kısırılık sebebinin sperm hareketliliğini ve kromatin bütünlüğünü bozan ve oksidatif stresi arttıran sigara dumanı bileşeni ve kanserojen bir madde olan BaP (benzopiren) kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Resveratrolün, antagonist ve antioksidan özellikleri sayesinde, BaP'ın etkisini baskılayarak sperm hareketliliğini, anormal kromatin kompaktlığını iyileştirdiği ve oksidatif stresi düşürdüğü bulunmuştur (Alamo ve diğerleri, 2019).

Kanser-kemopreventif etkisi

Resveratrol kanser hücrelerine karşı kemoterapötik ve sitotoksik etkiler göstermektedir. Ayrıca ilaca dirençli tümör hücrelerini ilaca bağlı etkilere duyarlı hale gelmesinde hassasiyet kazandırmaktadır. Bu bulgular, resveratrol'ün kanser hastalığının klinik tedavisinde potansiyel uygulama alanı olduğunu öne çıkarmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar resveratrol'ün potansiyel bir kemopreventif ajan olduğunu ortaya koymaktadır. Resveratrol'ün cilt, karaciğer, kolon, meme, akciğer dahil olmak üzere çok çeşitli tümörlerde kemopreventif bir rol oynadığı bir çok araştırma ile gösterilmiştir (Cal ve diğerleri, 2003). Resveratrol'ün birkaç kemopreventif etkisi bildirilmiş olmasına rağmen buna yönelik *in vivo* çalışmalar oldukça azdır (Cal ve diğerleri, 2003).

1999 yılında Lu ve Serrero tarafından yapılan bir çalışmada, resveratrol'ün östrojen reseptörü (ER) -pozitif meme kanseri MCF-7 (insan meme adenokarsinoma hücreleri) hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca resveratrol'ün kendisi de kısmi bir ER agonisti olduğunu, hem hücresel seviyede (hücre büyümesi) hem de moleküler seviyede (gen aktivasyonu) doza bağlı bir şekilde E2'nin (östradiol) büyümesini uyarıcı etkisi olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Lu ve Serrero, 1999).

2016 yılında Koga ve arkadaşları tarafından resveratrol'ün yumurtalık karsinomu hücre hatlarına etkisi hakkında testler yapılmış olup kanserli hücrelerin çoğalmasını ve hayatta kalmasını engellediği bulunmuştur (Koga, 2016).

Anti-obezite etkisi

Resveratrol'ün obezite üzerinde de olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Yüksek yağ diyetinde olan farelere resveratrol takviyesi yapıldığında, vücut ağırlığı artışını, visseral yağları adipogenez ve iltihaplanma ile ilgili plazma biyobelirteçlerini azalttığı gösterilmiştir (Kim, Jin, Choi ve Park, 2011). Resveratrol'ün tokluğu artırabileceği ve aşırı yağ birikimini engellediği düşünülmektedir (Carpéné ve diğerleri, 2019). Ayrıca Nisan 2019'da Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile resveratrol'ün PKA / LKB1 / AMPK yoluyla mitokondriyal bozukluk ve oksidatif stresi tersine çevirerek yaşlı sıçanlarda yüksek yağlı diyet kaynaklı kas atrofisini önlediği gözlenmiştir (Huang ve diğerleri, 2019) Bu bulgular

resveratrolün sarkopenik obezitenin önlenmesi ve tedavisi için potansiyel olabileceğini göstermektedir.

Kardiyoprotektif etkisi

Resveratrol, kardiyovasküler hastalıklardan korunulması ve hastalığın gelişme riskinin azaltılmasında umut vadeden bir bileşen olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalara göre resveratrol, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL kolesterol) oksidasyonunu ve trombosit agregasyonunu azaltmakta ve önlemektedir (Das ve Das, 2010). Ayrıca, antiaterosklerotik etkisi dâhil olmak üzere bir dizi ek kardiyoprotektif özelliğe sahiptir. Dünyada, ateroskleroz ve koroner arter hastalığı (KAH), en önemli morbidite ve mortalite sebeplerinden biridir. Resveratrol, LDL kolestrol seviyesini düşürerek koroner aterosklerozun ilerlemesini ve morbidite/ mortalite oranının azalmasını sağlamaktadır (Nissen ve diğerleri, 2004). Trombosit agregasyonunu önleyici özelliğinden yola çıkarak, resveratrol tarafından Siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimi inhibe edilerek kan akışı sağlanmaktadır ve pıhtı oluşumu azaltılmaktadır (Sousa Cardoso, 2017).

Ayrıca resveratrolün sigara içen yetişkin bireylerde kardiyovasküler sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için klinik bir çalışma yürütülmüştür. Uzun süreli sigara içiminin, kardiyovasküler hastalığa neden olabileceği, yüksek konsantrasyonlarda C-reaktif protein (CRP) oluşumu ile antioksidan dengesizliğine ve enflamasyona yol açtığı sonucuna varılmıştır. Resveratrol ile tedavinin hastalarda sistemik enflamasyonu ve karaciğerden salınan CRP'yi azalttığı tespit edilmiştir (Bo ve diğerleri, 2013).

Anti-enflamatuvar etkisi

Resveratrol, sirtuin protein ailesinin memeli formlarından biri olan SIRT1'in bir aktivatörüdür. SIRT1, transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere histonları ve histon olmayan proteinleri deasetile eder. SIRT1 tarafından düzenlenen yolak, metabolizmayı, stres direncini, hücre sağ kalımını, hücresel yaşlanmayı, enflamasyon-bağıışıklık fonksiyonunu, endotel fonksiyonlarını ve sirkadiyen ritimleri etkilemektedir. Literatürde resveratrolün SIRT1'i aktive ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle enflamasyon ve hücre döngüsü kusurlarından etkilenen hastalıklara fayda sağladığı tahmin edilmektedir (Chung, Yao, Caito, Hwang, Arunachalam ve Rahman, 2010). Yapılan çalışmalar sonucunda, resveratrolün

enflamasyonu, immün cevabı ve uyaranlara hücrel cevabı düzenleyen nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolunu etkilediği ortaya çıkmıştır. Ek olarak, IGF-1R / Akt / Wnt yollarını önemli ölçüde inhibe ettiği ve p53'ü (tümör baskılayıcı protein) aktive ettiği gösterilmiştir. Bu da hücre gelişimini ve tümör oluşumunu etkilemektedir (Kundu, 2006).

Ayrıca resveratrolün antiviral, antibakteriyel ve antidiyabet gibi sayabileceğimiz birçok etkisi vardır. Literatürde resveratrolün HIV1 'e ve *Herpes simpleks* virüsüne karşı antiviral etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (Docherty ve diğerleri, 2005). Antidiyabet etkisine bağlı olarak yaşa bağlı, kronik Tip II diyabet gibi hastalıkların başlangıcını geciktirmekte olup insülin duyarlılığını arttırmakta ve kanda glikoz seviyelerini azaltmaktadır (Wu ve diğerleri, 2016).

2.1.4. Literatürde yer alan resveratrol çalışmaları

Terapötik olarak büyük bir potansiyele sahip olan resveratrol bir takım sınırlamalarla karşı karşıyadır. Kısa biyolojik yarı ömrü, hızlı metabolizması, kimyasal olarak kararsız olması, yüksek derecede ışığa duyarlı olması ve suda düşük çözünürlük göstermesi nedeniyle düşük biyoyararlanım sergiler (Wang ve diğerleri, 2017). Zayıf biyoyararlanımı, hedef dokulara başarılı bir şekilde ulaşmasını ve tedavinin sağlanmasını engellemektedir (Berman, Motechin, Wiesenfeld ve Holz, 2017). Resveratrol, kan dolaşımına ulaştıktan sonra hızla emilir, karaciğerde metabolize edilir ve hızlı bir şekilde elimine edilir.

Literatürde bileşiğin stabilitesini, biyoyararlanımını ve suda çözünürlüğünü arttırmak için mikro ve nano boyutta kapsüllenmesine odaklanılmıştır. Enkapsülasyon yöntemi ilacın zayıf yönlerinin geliştirilmesinde potansiyel bir yaklaşım sunmaktadır.

Lee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2013), resveratrol içeren yer fıstığı ekstresinin mikroenkapsülasyon yöntemi ile fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Mikropartiküller, emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanmış ve sonrasında püskürterek kurutma yöntemi ile toz haline getirilmiştir. Mikrokapsüllerinin, pH, viskozite, renk ve lezzet gibi özelliklerini kaybetmeden takviye gıda olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Lee, Mijan, Ganesan, Yoo ve Kwak, 2013).

Peng ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2010) vanilinin kitosan ile çapraz bağlanması ile resveratrolün enkapsülasyonu ve kontrollü salımı ele alınmıştır. Çalışmanın sonucuna göre vanilindeki aldehit grupları ve kitosandaki amino grupları, schiff baz reaksiyonuna girmekte ve resveratrolün stabilizasyonunu ve kontrollü salımını destekleyecek bir ağ yapısı oluşturmaktadır. Mikroküreler emülsiyon kimyasal çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanmış ve çapraz bağlayıcı olarak vanilin kullanılmıştır. Resveratrolün mikroküreler içerisindeki kapsülleme verimliliği %93.68'e kadar çıkmıştır. Mikroküreler içinde hapsedilen resveratrolün serbest resveratrol ile karşılaştırıldığında ışıktan ve ısıdan korunduğu sonucuna varılmıştır (Peng ve diğerleri, 2010).

Koga ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2016), kapsüllenmiş resveratrolün UV ışığı ve gastro-instestinal sindirime karşı göstermiş olduğu stabilite araştırılmıştır. Peynir altı suyu proteini konsantresi ve sodyum kazeinat kaplayıcı malzeme olarak kullanılmıştır. Mikrokapsüller spreyle kurutma (püskürterek kurutma) yöntemiyle hazırlanmıştır. Sodyum kazeinatın peynir altı suyu protein konsantresine nazaran daha iyi bir kapsülleme malzemesi olduğunu ortaya çıkmıştır. Sindirim stabilitesinin, resevratrolün kapsüllenmesiyle arttığı gözlenmiştir. UV stabilitesi ise trans/cis oranları ölçülerek değerlendirilmiştir (Koga, Andrade, Ferruzzi ve Lee, 2016).

Sanna tarafından yapılan bir diğer çalışmada (2015) ise resveratrolün farklı konsantrasyonlarda kitosan ve poli D, L-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) polimerik matrisi kullanılarak hazırlanan mikrokapsüllere değinilmiştir. Mikroküreler çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Elde edilen küreler, kitosan konsantrasyonuna bağlı olarak %40-52 oranında kapsülleme verimine sahiptir. Kitosan içeren mikroküreler PLGA içerenlerden daha düşük bir resveratrol salımı sergilemiştir. Test edilen tüm kapsüllenmiş formülasyonların, 6 aya kadar iyi bir şekilde korunduğu ve saklanan mikrokapsüllerin iyi bir stabilite gösterdiği sonucuna varılmıştır (Sanna, 2015).

Cho ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada (2014), farklı konsantrasyonlarda resveratrol yüklü kalsiyum aljinat mikroküreleri hazırlanarak fizikokimyasal özellikleri ve etken madde salım özellikleri incelenmiştir. Mikroküreler iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Resveratrol yüklü mikrokürelerde %95'in üstünde bir kapsülleme verimi (EE) gözlenmiştir. Çapraz bağlayıcı oranının artmasıyla daha yüksek bir EE gözlenmiştir.

Dondurularak kurutulmuş mikrokürelerin daha yavaş bir salım gösterdiği sonucu çıkarılmıştır (Cho, Chun , Kim ve Park, 2014).

Resveratrolün enkapsülasyonuna ilişkin birçok çalışma mevcuttur. Literatürde yer alan diğer çalışmaların bir kısmına Tablo 2.1’de yer verilmiştir. Literatür incelendiğinde, resveratrolün kapsüllenmesinde tercih edilen polimerin, çapraz bağlayıcının ve uygulana yöntemin önem arz ettiği sonucuna varılmaktadır. Yaygın olarak polifenolik maddelerin kapsüllenmesinde biyobozunur polimerler tercih edilmektedir.

Çizelge 2.1. Literatürde yer alan resveratrol yüklü mikro/nano partikül çalışmaları

Enkapsülasyon Materyali	Hazırlama Metodu	Sonuç	Tutuklama Verimi	Referans
Biotin ve avidin ile modifiye edilmiş kitosan nanopartikülleri	Emülsiyon kimyasal çapraz bağlama metodu	Hepatik karsinomu hedef alan potansiyel ilaç salım sistemi olduğu sonucuna varılmıştır. HepG2 hücrelerine karşı gelişmiş inhibitör oranına sahiptir.	Kitosan-NP %65.7 ± 1.8 B-Ks-NP- %64.4 ± 1.2 A-B-KS-NP %66.4 ± 1.8	Bua et al. (2013)
Katı lipid nanopartikülleri	Emülsifikasyon ve düşük sıcaklık solidifikasyon metodu	Meme kanseri tedavisi için potansiyel bir araçtır. Kanser hücresi apoptozunu ve ölümünü indüklemiştir.	İlaç yükleme kapasitesi %26	Wang et al. (2017)
β-laktoglobulin nanopartikülleri	İyonik jelasyon metodu	Caco-2 hücrelerinde sitotoksikite görülmemiştir. Nanopartikül, stabiliteyi artırarak resveratrolün verimini artırmıştır.	%96,9	Kim et al. (2016)
Chitosan -TPP mikroküresi	İyonik jelasyon metodu		%94,59	Cho et al. (2014)
Glutaraldehit çapraz bağlı jelatin	Koaservasyon-faz ayırma metodu	Biyoyararlanımı artırmış ve serbest RSV'den daha uzun yarı ömre sahiptir. Kanser hücresi apoptozunu indüklemiştir.	%93,6	Karthikeyan et al.(2013)
Apolipoprotein E ile fonksiyonelleştirilmiş katı lipid nanopartikülleri	Yüksek kesme homojenizasyon metodu ve ardından sonikasyon ultrason yöntemi	Nöroprotektif etki sağlamıştır.	%90	Neves et al.(2016)
Poli (epsilon-kaprolakton) (PCL) poli (D, L-laktik-ko-glikolik asit) -poli (etilen glikol) konjuge (PLGA-PEG-COOH) nanopartiküller	Nanopresipitasyon metodu	Prostat kanseri hücrelerinin büyümesini önlemiştir.	%74 - %98	Sanna et al.(2013)

(NP:nanopartikül, B-Ks-NP:Biotin Kitosan Nanopartikül, A-B-KS-NP:Avidin Biotin Kitosan Nanopartikül)

2.2. Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite değerlendirmelerinde kullanılan farklı yöntemler mevcuttur ancak bir bileşiğin antioksidan özelliklerini ölçerken birçok değişken dikkate alınmak zorunda

olduğundan, sonuçların dikkatli bir şekilde ele alınması gerekir. Bir bitki kaynağında görülen antioksidanların, kapasiteleri hakkında tam olarak bilgi sağlayan evrensel bir yöntem yoktur (Litescu, Eremia ve Radu, 2010).

Antioksidanlar, radikalleri iki ana mekanizma(kimyasal reaksiyon) ile devre dışı bırakabilmektedir:

- 1- Hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonu
- 2- Singlet elektron transferi (SET) reaksiyonu

Sonuç her iki mekanizmada da radikal süpürücü kapasitesini ölçmeye yönelik olup antioksidan kapasiteyi ölçmede uygulanan yöntemler HAT ve SET reaksiyonlarına dayanmaktadır (Prior, Wu ve Schaich, 2005).

HAT reaksiyonuna dayanan ölçüm yöntemlerinde, antioksidanın hidrojen atomu vermesi ile serbest radikalleri süpürme potansiyeli ölçülmektedir. SET reaksiyonuna dayanan ölçüm yöntemleri ise antioksidanların elektron transfer etmesi ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşiklerin indirgenme kapasitesinin ölçümüne dayanmaktadır (Prior ve diğerleri, 2005). Oksidanın indirgenmesi ile renk değiştirmesi, antioksidan tarafından ne kadar güçlü indirgenebildiğini ölçmektedir.

Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri;

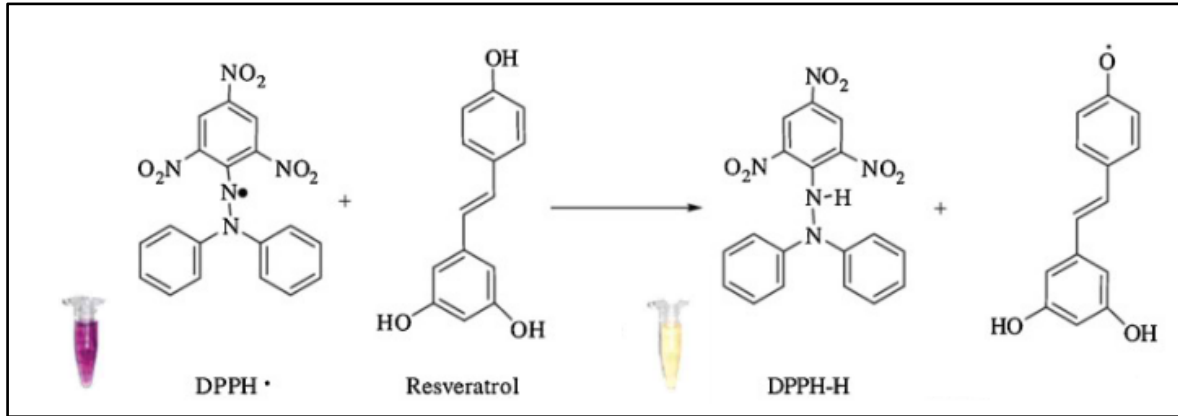
- Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- Lipid peroksidasyon inhibisyon kapasitesi(LPIC)
- Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu
- ABTS antioksidan kapasite ölçüm yöntemi
- Crocin bleaching yöntemi
- Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü
- DPPH (1,1-difenil -2-pikrilhidrazil) radikal temizleme aktivitesi tayini

- Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi (Frankel ve Finley, 2008).

En sık rastalanan antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinden biri DPPH'tir.

2.2.1. DPPH (1,1-difenil -2-pikrilhidrazil) radikal temizleme aktivitesi tayini

Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan DPPH metodunda spektrofotometrik olarak ölçülebilen güçlü bir mor renge sahip olan stabil serbest radikal DPPH kullanılmaktadır. Bir elektron transfer edebilen veya hidrojen verebilen bileşiklerin varlığında, DPPH renksiz hale gelmektedir (Holtz, 2009). Bu yöntemde polifenollerin ekstraksiyonları, antioksidan kapasitelerini görmek amacıyla DPPH radikal süpürücü ile taranmaktadır. Radikal, etanol çözeltisinde kararlı haldedir. Antioksidan özelliğe sahip ekstreler DPPH'yi temizler ve DPPH radikali oranını azaltır. Bu radikal 515-517 nm'de maksimum absorbands göstermektedir. İlk solüsyondaki mor renk serbest radikalın antioksidanlar tarafından bloke edilmesiyle sarıya döner. Bu metot radikal temizleme aktivite tayinlerinde kısa sürmesi ve kolay olması sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadır (Boskou, 2010). DPPH analizinde, belirlenen derişimde DPPH çözeltisi ve numunenin çözeltisi karıştırıldıktan sonra absorbands okunmaktadır.



Şekil 2.8. DPPH radikalının formülü (Boskou, 2010)

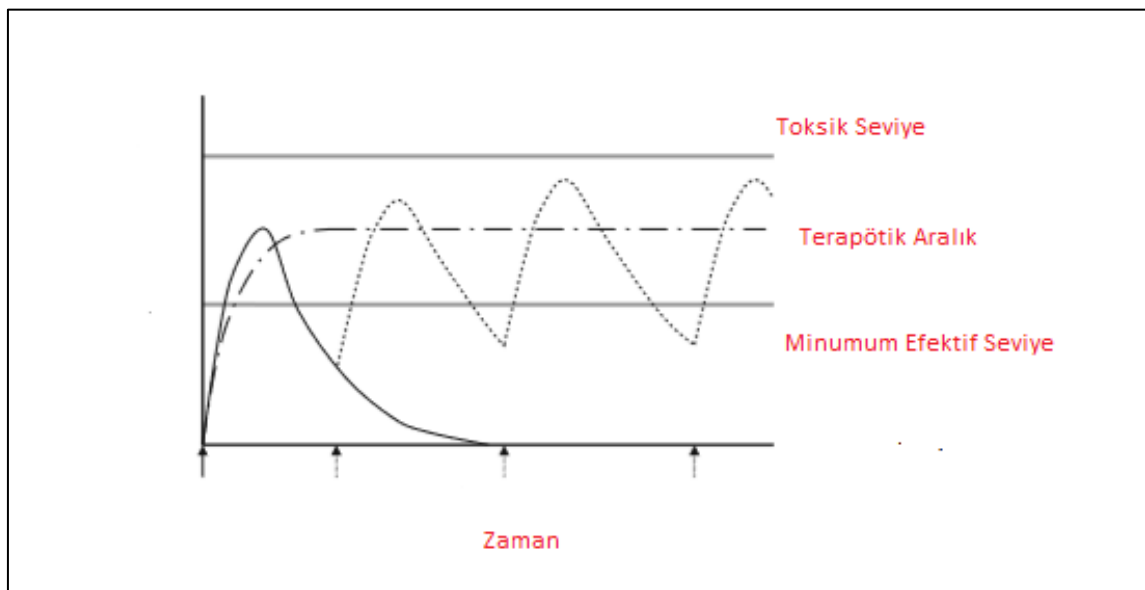
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Biyoteknoloji, genomik ve kimya alanındaki gelişmelerle birlikte, çok çeşitli, yeni daha güçlü ve spesifik terapötikler ortaya çıkmıştır. Düşük çözünürlük ve ilaçların birçoğunun çok yüksek ve/veya zayıf stabilitesi gibi sebepler nedeniyle ilacın etkinliğini ve potansiyelini

etkileyen problemler gözlenebilmektedir. Bu nedenle ilaç salım sistemlerinde daha güvenli ve daha etkili yöntemlere ve cihazlara ihtiyaç duyulmuştur. İlaç salım sistemleri, gerekli miktarda ve doğru zamanda vücuttaki uygun yere bir terapötik ajan temin etmek üzere, etkinliği optimize edecek, uygunluğu artıracak ve yan etkiyi en aza indirecek şekilde tasarlanmış sistemlerdir (Pack, 2006).

Kontrollü ilaç salım sistemleri, geleneksel uygulama yöntemleriyle ilgili zorlukların çoğu ele alınarak geliştirilmiştir. Genellikle çok parçacıklı ilaç salım sistemleri oral, parenteral ve topikal formülasyonlara ve uygulamalara yöneliktir. Kontrollü ilaç salım sistemleri, ilacı bir kaplayıcı madde içine hapsederek polimer bazlı diskler, çubuklar, topaklar, beadler mikrokapsüller, mikro küreler, liposferler, mikro parçacıklar ve nanaopartiküller gibi taşıyıcı sistemler aracılığıyla kontrollü oranlarda salılabilmektedir (Gaikwad , Pathade, Bidkar ve Pawar , 2011).

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin temel mantığı; ilacın en uygun rotası belirlenerek biyofarmasötik, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini optimize etmek, asgari miktarda ilaç kullanarak durumu mümkün olduğunca en kısa sürede kontrol altına almaktır. Aynı zamanda bu sistemler aracılığıyla ilacın kanda sabit dozaj seviyesinde kalması sağlanabilir, dozaj sıklığı ve yan etkileri azaltılabilir, böylece hasta uyuncu artırılır (Young, Koleng ve McGinity, 2002).



Şekil 2.9. Kan serumundaki ilacın alışılmış dozaj şekilleri ve kontrollü salım şekli

Özetle, kontrollü ilaç salımı ilacın belirli bir süre için belirli bir oranda salınması olayına denir ve hasta uyumu ile birlikte etkinliğin artırılması ve tekrarlanan kontrolsüz dozajlardan kaynaklanan istenmeyen yan etkilerin azaltılması salım sisteminin ana tasarım amacıdır. Polimer bilimindeki gelişmelerle birlikte ilaç sistemlerinin gelişmesi hız kazanmıştır (Giri, Kumar, Alexander, Ajaz, Badwaik, Tripathy ve Tripathy, 2013).

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajları;

Kontrollü salımın ana amaçları arasında biyolojik aktif maddelerin, vitaminler ve minerallerin işlenmesi ve depolanması sırasında aktif madde kaybını azaltmak, emilimi optimize etmek ve etkinliğini arttırmak yer almaktadır. Aktif madde salımında etkili olan başlıca mekanizmalar pH, sıcaklık, çözücü kullanımı, difüzyon, bozunma ve şişme veya ozmotik basınçtır. Bu tür sistemler geleneksel uygulama yöntemlerine göre birkaç potansiyel avantaj sunmaktadır.

İlk olarak, ilaç salım hızları, belirli bir uygulamanın ihtiyaçlarına göre uyarlanabilmektedir; örneğin, sabit bir salım oranı sağlamak gibi. İkincisi, kontrollü ilaç salım sistemleri sık (örneğin günlük) dozları nadir (ayda bir veya daha az) enjeksiyonla değiştirerek hastanın rahatlığını ve uyumluluğunu artırabilmektedir (Pack, 2006)

2.3.1. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırması

Kontrollü salım sistemlerinde ilacın uygulama yolu ve mekanizmasına göre iki ana alt sınıflandırmaya gidilmiştir.

Kontrollü salım sistemlerinde salım mekanizmaları

Kontrollü salım sistemlerinde en yaygın olarak uygulanan üç mekanizma bulunmaktadır. Bunlar matris, rezervuar ve ozmotik sistemlerdir. Bunlar arasında difüzyon, hem matriks hem de rezervuar sistemlerinde kilit bir rol oynarken, ozmotik basınç, ozmotik sistemlerden ilaç salımının baskın mekanizmasıdır. Teknolojinin erişilebilirliği, üretimi, maliyeti ve diğer hususlar nedeniyle, difüzyona dayalı kontrolü salım mekanizmaları ozmotik sistemlerden daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, 1998 ve 2003 yılları arasında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan 29 kontrollü salım teknolojisi ürünlerin 12'si matris

sistemlerine ve 10'u rezervuar teknolojilerine, 2'si ise ozmotik sistemlere dayanmaktadır (Siepmann , Siegel ve Rat, 2012).

Ancak literatürde kontrollü salım sistemleri için mevcut olan salım mekanizmaları dört ana kategoride sınıflandırılmaktadır.

- (1) Difüzyon kontrollü sistemler
- (2) Kimyasal kontrollü sistemler
- (3) Çözücünün aktive ettiği sistemler
- (4) Manyetik kontrollü sistemler

(1) Difüzyon kontrollü sistemler

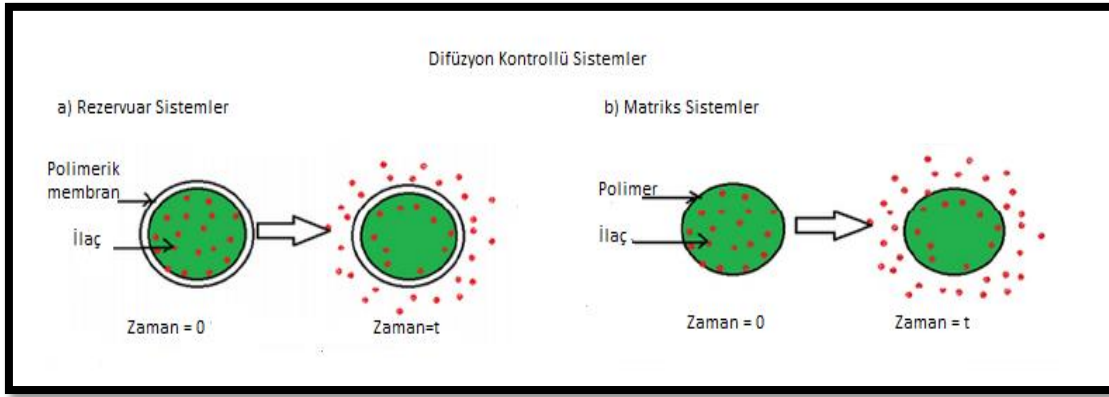
Difüzyon kontrollü sistemler rezervuar ve matris sistemler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Bu yöntemde, çekirdek veya aktif madde, rezervuar sistemi veya matriks sistemleri içinde bulunan gözeneklerden difüzyonla serbest bırakılır (Risch, 1995).

Rezervuar sistemler

Genellikle küresel, silindirik veya disk şeklinde olup toz veya sıvı formda bir ilaç etken maddesinden oluşmaktadır. Biyolojik olarak parçalanamayan bir polimerik malzeme tabakası ile çekirdek yani ilaç etken maddesi kaplanır. İlacın ve polimerin özellikleri ilacın difüzyon hızını ve bunun kan dolaşımına salım hızını belirler. Rezervuar sistemler ile ilgili sorunlardan biri, polimer bozulmadan kaldığı için böyle bir sistemin ilacın tamamen salınmasından sonra vücuttan çıkarılması gerekliliğidir. Bir diğeri ise eğer rezervuar membranı yanlışlıkla kırılırsa, tolere edilemeyecek kadar yüksek miktarda ilacın aniden kan dolaşımına salınmasıdır. Bir rezervuar sisteminden ilacı serbest bırakma oranı, geçirgenliğe, alana ve bariyerin kalınlığına bağlıdır (Ranade ve Hollinger, 2004).

Matriks sistemler

İlaç, polimer matriksi boyunca homojen bir şekilde dağılmaktadır ve polimer içine enkapsüle edilen ilaç etken maddesi önce çözünür daha sonra matriks sistemi içerisinde difüzyonla serbest bırakılır (Zaman ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.10. Difüzyon kontrollü sistemlerin şematik görünümü

(2) Kimyasal kontrollü sistemler

Kimyasal kontrollü sistemler biyolojik olarak bozunabilen sistemler ve zincire takılı sistemler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Biyolojik olarak bozunabilen sistemler: Bu sistemlerin farkı ilacı çevreleyen polimerin biyobozunur olmasıdır. Polimerde bozunma meydana geldikçe ilaç salımı gerçekleşmektedir. İlaç polimer içinde düzgün dağılım gösterir ve polimer parçalanırken ilaç yavaş yavaş salınır. Polimerlerin, ilaç salımı tamamen gerçekleştikten sonra vücuttan çıkarılması için herhangi bir cerrahi müdahale gerekmemesi ve ilacın suda çözünür olması şartının olmaması en önemli avantajlarındandır (Ranade ve Hollinger, 2004).

Zincire takılı sistemler: Bu sistemde ilaç etken maddesi polimer zincirine kimyasal olarak bağlanmıştır. İlaç polimere doğrudan veya bir “ara grup” ile bağlanabilmektedir. Aradaki bağın kimyasal hidroliz veya enzimatik reaksiyon ile ayrılması sonucu ilaç kontrollü bir şekilde salınmaktadır (Ranade ve Hollinger, 2004).

(3) Çözücünün aktive ettiği sistemler

Çözücü ile aktifleştirilen sistemler şişme kontrollü sistemler ve ozmotik kontrollü sistemler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Fan, 1989).

Şişme kontrollü sistemler: Bu sistemlerde, polimer çözünmeden çok fazla miktarda su tutar. Sistem, üç boyutlu bir ağ oluşturmak için çapraz bağlı hidrofilik makromoleküllerden

oluşmaktadır. Bu tür sistemler, polimerin şişmesiyle kontrollü bir oranda, düşük molekül ağırlıklı çözeltiler için geçirgen hale gelmektedir (Azevedo ve Reis, 2005).

Ozmotik kontrollü sistemler: Düşük ilaç konsantrasyonu içeren veya ilaç içermeyen vücut sıvısı, yarı geçirgen polimer membran boyunca, ilacın yüksek konsantrasyonda olduğu bölgeye hareket eder. Osmotik basınç, membranın bir yanı ile diğer yanı arasındaki konsantrasyon gradyanını azaltma eğilimindedir. Sıvı yarı geçirgen zardan geçerken, ilaç çözülme (Ranade ve Hollinger, 2004)

4) Manyetik kontrollü sistemler

Antitümör ajanların seçici hedeflenmesi toksik etkileri en aza indirirken kanser kemoterapisinde önemli bir amaç olmuştur. Geleneksel olarak kullanılan sistemik antineoplastik ajanlar istenilen etkiyi gösterememiştir. Bu sebeple kanser kemoterapisinde kullanılmak üzere albümin ve manyetik mikro kürelerden oluşan manyetik olarak duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Manyetik özelliklerinden ötürü, geliştirilen mikroküreler uygulanmak istenilen alana özgü salım yeteneğine sahiptirler (Ranade ve Hollinger, 2004).

Uygulama yoluna göre kontrollü ilaç salım sistemleri

Kontrollü ilaç salım sistemleri aracılığıyla ilacın uygulama sıklığı ve sistemik yan etkiler azaltılabilmekte ve hasta uyumu artırılabilir. Kontrollü ilaç salımı oral, bukkal, transdermal, oküler, nazal, pulmoner ve parenteral yollar dahil olmak üzere çeşitli uygulama yolları ile sağlanabilmektedir. Bu uygulama alanlarından en yaygın olarak kullanılan parenteral (intravenöz, subkutan ve intramüsküler enjeksiyon yolu) ve oral uygulama yöntemidir. Bu uygulama yöntemlerinde daha çok biyobozunur polimerler tercih edilmektedir. Biyobozunur polimerler salım aşamasında vücutta güvenle ayrışır ve cerrahi ekstraksiyona gerek kalmaz. 1989 yılında FDA, ileri prostat kanserinin tedavisi için ilk biyolojik olarak parçalanabilen polimerik kontrollü ilaç salım sistemi Lupron® Depot'u onaylamıştır. Lupron® Depot, intramüsküler olarak uygulanan, uzun süreli löprolid iletimi sağlayan bir süspansiyon dozaj şeklidir. PLGA yavaş yavaş vücutta hidrolize olur, haftalar ile aylar arasında löprolid salımı yapar. Son yıllarda ise biyolojik olarak parçalanabilen çok sayıda polimerik salım sistemleri piyasaya sunulmuştur (Siepmann , Siegel ve Rat, 2012).

1-Oral uygulamalar

Oral uygulama, ilaç alım yollarından en yaygın olan yöntemdir. Birçok ilacın zayıf çözünürlüğü, stabilitesi ve biyoyararlanımı, gastrointestinal sistem tarafından terapötik seviyelere ulaşılmasını zorlaştırmaktadır. İlaç salımı, asidik bir mide ortamı ve mide-bağırsak kanalını koruyan mukusun sürekli salgılanması gibi birçok engeli aşmalıdır. Bu nedenle ilaçları bozulmaya karşı koruyabilen ve bunları gastrointestinal kanal içinde öngörülen bölgelere ulaştırabilen mikro/nanopartikül ilaç taşıyıcıları daha yetkin olabilmekte ve sürekli ilaç salım avantajı sağlanabilmektedir (Giri, 2016).

2-Parenteral uygulamalar

İlaçlar enjeksiyon veya infüzyon yoluyla doğrudan vücuda uygulanabilmektedir. Bu uygulama şekli parenteral uygulama olarak adlandırılmaktadır. Vücuda uygulama yerine bağlı olarak, intravenöz, intramüsküler, subkütan, intradermal ve intraperitoneal uygulama şekli olabilir. Genellikle intravenöz uygulama için sulu çözeltiler kullanılır, ancak dozaj formuna dikkat edilmesi, emboliye sebep olmayacak kadar küçük partiküller olması gerekmektedir. Bu uygulama şeklinde deri altı enjeksiyonda iğne derinin altındaki yağ dokusuna yerleştirilir. İlaç dozajı enjeksiyon bölgesi başına 2,5 mL'den az olmalıdır. İnsülin genellikle bu yolla uygulanmaktadır. İntramüsküler enjeksiyonda ise kas içine enjeksiyon yapılır. Deri içine daha büyük hacimlerde (5 mL'ye kadar) verilmesi gerektiğinden subkutan yoldan tercih edilmektedir. İntravenöz enjeksiyonda ise iğne doğrudan damar içine yerleştirilir. Bu, hızlı bir şekilde kesin bir doz vermenin en kolay yoludur. Çok hızlı biyolojik cevap vermektedir, oldukça küçük partiküller uygulanmaktadır. İntradermal enjeksiyon ise cilt içine verilmektedir. Bu parenteral uygulama şekli genellikle alerji cilt testlerinde kullanılmaktadır (Perrie ve Rades, 2010).

3-Nazal uygulamalar

Oral, parenteral ve diğer ilaç uygulama yollarından kaynaklı sorunlar nedeniyle, bilim adamlarının ilgisi, bazı ilaçlar için intranasal yollar ile uygulama yönüne kaymıştır. İlaçların nanoparçacıklara yüklenmesi, burun boşluğu içindeki bozucu ortamdan korunmalarını ve mukozal bariyerlerden enine şekilde taşınmalarını kolaylaştırmak için ortaya çıkan kolloidal formülasyonlar umut vadeden bir yaklaşım sunmuştur. Örneğin Haque ve arkadaşları

(2014), intranazal burundan beyine giden yol ile depresyon yönetimi için venlafaksin yüklü aljinat nanoparçacıklarının potansiyelini araştırmıştır. Nanoparçacık nazal tedavisi, nazal ve tablet oral solüsyonuna kıyasla davranış analizi parametrelerini (yüzme, tırmanma ve hareketsizlik) önemli ölçüde geliştirmiştir (Haque, 2014).

4-Transdermal uygulamalar

Transdermal ilaç salımı, oral ve parenteral (enjekte edilebilir) ilaç salım sistemine alternatif bir uygulama şekli sunmaktadır. Lokal tahriş ve toksisitenin olmaması en önemli avantajlarından. Ancak transdermal uygulamaların klinik uygulamaları oldukça azdır ve transdermal olarak çok az sayıda ilaç verilebilmektedir. Derinin *stratum corneum* tabakası ilaçların deri yoluyla sızmasını sınırlandıran bir bariyer görevi görmektedir. Mikro/nano taşıyıcılar, ilaçları doğrudan *stratum corneum* üzerinden iletmek için önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Bhoyar, Giri, Tripathi, Alexander ve Ajazuddin, 2012).

2.4. Mikroküreler ve Mikroenkapsülasyon

2.4.1. Mikroküreler

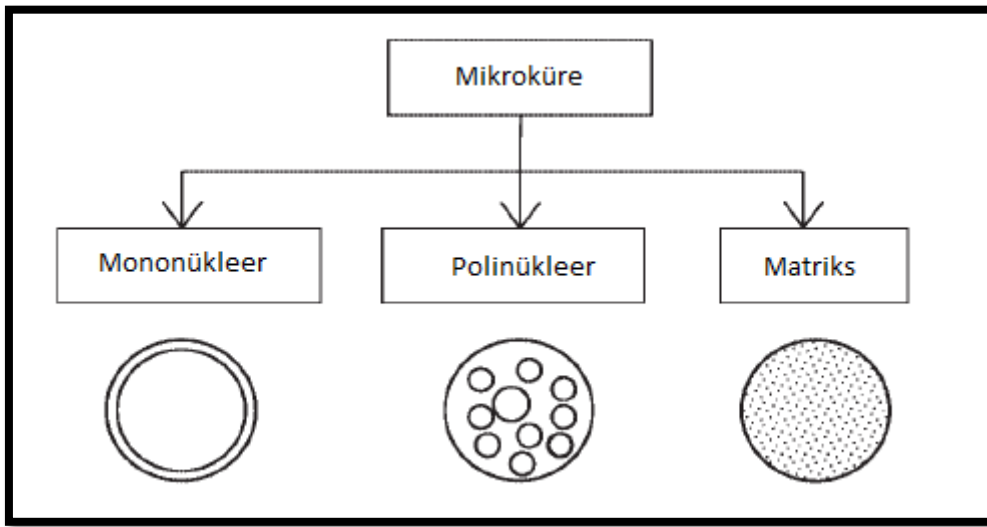
Mikro kapsülleme metodunun uygulanması sonucunda ortaya çıkan küre benzeri ürüne "mikrokapsül", "mikroküre", "mikropartikül" denir. Bu tür kapsüller mikrometre boyutunda ve küresel veya düzensiz bir şekle sahiptir. Mikrokapsüller, çekirdek ve kabuk olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır (Thies, 1996). Literatürde kapsüllenen malzeme yani çekirdek malzeme, aktif madde, iç faz veya yük taşıma fazı olarak da geçmektedir. Çekirdeği kaplayan madde ise duvar malzemesi, kaplama malzemesi, membran, kabuk, taşıyıcı malzeme, dış faz veya matris olarak adlandırılmaktadır (Jeyakumari, Zynudheen ve Parvathy, 2016). Çekirdek (iç kısım) aktif bileşeni içerirken, kabuk (dış kısım) çekirdeği kalıcı olarak veya geçici olarak dış atmosferden korumaktadır (Thies, 1996). Kabuk malzemesi genellikle çözünmez ve çekirdek ile tepkimeye girmez (Gibbs, Kermasha, Alli ve Mulligan 1999).

Bir partikülün mikropartikül olarak kabul edilmesi için her bir partikülün 1-1000 µm aralığında olması gerekmektedir. Birçok çalışmada, mikropartikül çapı 100 µm'den küçüktür ve 0.5-10 µm aralığında olanlar genellikle nanopartikül olarak adlandırılmaktadır.

Mikrokapsüllerdeki çekirdek malzemeler katı, sıvı veya gaz formda bulunabilmektedir. Çekirdek malzemenin kabukla uyumluluğu, mikro kapsülleme verimliliğinin artırılması için önemli bir kriterdir ve çekirdek malzemenin ön işleminden geçirilmesi, bu tür uyumluluğun artırılması için sıklıkla yapılmaktadır. Çekirdek malzemenin büyüklüğü difüzyon, geçirgenlik veya kontrollü salım uygulamaları için de önemli bir rol oynamaktadır (Ghosh, 2006).

Mikroküre oluşturma metodu, kapsüllemesi ve ilacın salınmasında önemli bir faktördür. Ek olarak, polimerin tipi, polimerin moleküler ağırlığı, kopolimer bileşimi ve mikroküre formülasyonuna ilave edilen herhangi bir maddenin niteliği (terapötiklerin stabilizasyonu için) gibi birçok faktör ilaç salım hızında önemli rollere sahiptir. İlk olarak mikroküre hazırlanırken kullanılan polimer tipi ve polimerin parçalanma şekli önemli ölçüde ilaç salım oranlarını etkilemektedir (Pack, 2006).

Mikroküreler morfolojileri temelinde mononükleer, polinükleer ve matris türleri olarak sınıflandırılmaktadır. Mononükleer (çekirdek-kabuk) mikrokapsüller, çekirdeğin etrafındaki kabuğu ifade ederken polinükleer kapsüller, kabuk içine alınmış birçok çekirdeği ifade etmektedir. Matris kapsüllemesinde ise çekirdek malzeme kabuk malzemesine homojen olarak dağıtılmaktadır. Bu üç temel morfolojiye ek olarak, mikrokapsüller ayrıca çoklu kabuklarla mononükleer olabilir veya mikrokapsül kümeleri oluşturabilir (Ghosh, 2006).



Şekil 2.11. Mikroküre morfolojisi (Pack, 2006)

Mikroküreler terapötik ilaçların hedef hücrelere verilmesinde, spesifik enzim taşınmasında, hedef dokulara kök hücre verilmesinde veya diğer enzimler için farklı uygulamalarda önemli role sahiptir. Araştırmalar, mikro/nano parçacık ilaç sistemlerinin, vücuda alınan ilaçların çözünürlüğünün artırılması ile emilimin artırılması ve *in vivo* biyoyararlanımının artırılması gibi önemli avantajlara sahip olduğunu göstermiştir. Bu sistem aynı zamanda, yavaş salım özelliği ile ilacın etkisini de uzatır. Mikroküreler aracılığıyla ilaç spesifik hedef organlara veya hücrelere hedeflendirilebilmekte ve ilacın yan etkileri azaltılabilmektedir (Kreuter, 2001).

2.4.2. Mikroenkapsülasyon teknolojisi

Mikroenkapsülasyon teknolojisi, dünya genelinde yaygın olarak uygulanan, terapötik potansiyeli yüksek ve hedef odaklı tedaviler için umut vadeden yöntemlerden biridir. Mikroenkapsülasyon yöntemi genel olarak farklı boyutlarda, kompozisyonlarda ve fonksiyonlarda mikro küreler, mikro emülsiyonlar, mikro parçacıklar ve mikro kapsüllerden oluşmaktadır (Sagis, 2015).

Aynı zamanda, mikroenkapsülasyon teknolojisi farmasötik, kimya, gıda ve tarım gibi çeşitli endüstrilerde kullanılan çok yönlü bir teknolojidir. Mikroenkapsülasyon teknolojisinin kullanılmasının bir nedeni aktif maddenin su, oksijen, ısı ve ışık gibi çevresel faktörlere maruz kalınması ile ortaya çıkan bozulmaları önlemektir. Böylece aktif maddenin raf ömrünü arttırmak gibi avantajlar sunabilmektedir. Bazı durumlarda kapsülleme istenmeyen tat, koku ve rengi maskelemek için de kullanılabilmektedir (Gaonkar, Vasisht, Khare ve Sobel, 2014).

2.4.3. Mikroenkapsülasyon üretim teknolojisinde kullanılan yöntemler

İstenilen kriterlere ve enkapsüle edilmiş malzemeye bağlı olarak aktif bileşenlerin ve bileşiklerin tutulması için birçok mikroenkapsülasyon yöntemi vardır. Mikroenkapsülasyon teknolojisi, kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki sınıftan oluşmaktadır, ikincisi daha sonra kendi içinde fiziko-kimyasal ve fiziko-mekanik tekniklere ayrılmaktadır. Fiziksel yöntem, püskürtmeli kurutma, santrifüjlü ekstrüzyon, akışkan yataklı kaplama, titreşimli nozzle ve benzerlerini içermektedir. Kimyasal mikroenkapsülasyon yöntemi, yerinde polimerizasyon, matris polimerizasyonu, çözücü buharlaştırma, arayüzey çapraz bağlama ve benzerlerini

içermektedir. Fizikokimyasal yöntem ise iyonotropik jelasyon, süperkritik akışkan teknolojisi, basit ve karmaşık koaservasyon ve polielektrolit kompleksleşmesini içermektedir (Gutcho, 1976).

Fenolik bileşiklerin biyoyararlanımını ve terapötik potansiyelini artırmak için öne çıkan birkaç mikroenkapsülasyon yöntemi vardır. Bunlar faz ayrılması veya çöktürme, iyonotropik jelasyon, emülsiyon / çözücü buharlaştırma ve / veya püskürterek kurutma yöntemleridir. (Yang, Chung ve Ping Ng , 2001).

Çizelge 2.2. Mikroenkapsülasyon yöntemleri (Benita, 1996).

Kimyasal işlemler	Fiziko-kimyasal işlemler	Fiziko-mekanik işlemler
Süspansiyon, dispersiyon, emülsiyon polimerizasyonu Polikondensasyon	Koaservasyon İyonotropik Jelasyon Katman katman düzeneği (Layer by Layer) Sol-gel kapsülleme Süperkritik CO ₂ destekli mikro kapsülleme	Püskürtmeyle kurutma Çoklu nozul püskürtme Sıvı yataklı kaplama Santrifüj teknikleri Vakum kapsülleme Elektrostatik kapsülleme

Spreyle kurutma yöntemi

Spreyle kurutma, farmasötik ve gıda endüstrileri için en uygun fiziksel yöntemdir. Çünkü hidrofilik ve hidrofobik fenolik bileşikler kolayca tutulur ve bunların biyoaktiviteleri bu yöntemle korunabilir. Püskürtmeli kurutma, aktif maddenin seçilen bir kaplama malzemesi ile emülsiyon haline getirilmesiyle yapılır ve homojenleştirilmiş karışım, spreyle kurutucuya yüklenir, aktif madde içeren kurutulmuş mikrokapsüller üretmek için emülsiyon bir ısıtma bölmesinden geçirilir. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon teknolojisinin uygulanması Samuel Percy'nin 1872'de keşfettiği spreyle kurutma yöntemine dayanmaktadır (Benita, 1996).

Emülsifikasyon yöntemi

Emülsifikasyon ile mikro kapsüllemeye, önce çekirdek, duvar malzemesinin bulunduğu organik bir çözücü içinde dağıtılır. Daha sonra, bir emülsiyon stabilizatörü içeren su veya yağda emülsiyon haline getirilir. Organik çözücü daha sonra karıştırıcı altında

buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve bu, çekirdeğin kapsüllendiği kompakt polimer kürecikler oluşmasını sağlar. Organik ve sulu fazdan oluşan bu yöntem ile iki fazdan oluşan tekli emülsiyon (yağ/su veya su/yağ) veya üç fazdan oluşan çoklu emülsiyon (su/yağ/su veya yağ/su/yağ) ile mikroküreler hazırlanmaktadır. Emülsiyonlaştırma esas olarak enzimleri, mineralleri, vitaminleri ve mikroorganizmaları kapsüllemek için kullanılmıştır (Silva, Fries, Menezes ve Holkem, 2014).

İyonotropik jelasyon yöntemi

İyonotropik jelasyon, polielektrolitlerin, zıt iyonların mevcudiyetinde çapraz jelasyon kabiliyetine dayanır ve ayrıca jelisfer olarak da adlandırılan mikroküreler oluşturur. Mikroküreler, ilaç yüklü bir polimerik çözeltinin, çok değerlikli katyonların sulu çözeltisine bırakılmasıyla meydana gelir. Katyonlar ilaç yüklü polimerik damlalara yayılır ve iyonik olarak çapraz bağlanmış bir parçanın üç boyutlu bir kafesini oluşturur. Biyomoleküller üç boyutlu yapılarını korumak için hafif koşullar altında bu jelisferlere yüklenebilir (Hemalatha, Lathaeswari, Suganeswari , Senthil Kumar ve Anto, 2011).

İyonotropik jelasyon tekniğinde, biyoyumlu ve biyobozunur olma özelliklerinden dolayı doğal polimerlerin ilaç taşıyıcı olarak kullanılması tercih edilmektedir. Aljinat, Jelatin, kitosan, pektin ve karboksimetil selüloz gibi doğal veya yarı sentetik polimerler iyonotropik jelasyon ile mikroenkapsülasyon yöntemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu doğal polielektrolitler kimyasal yapılarında belirli anyonlar / katyonlar bulundurulur. Bu anyonlar / katyonlar karşı iyonlarla bağlanarak ağ yapısı oluşturur ve çapraz bağlanma ile jelasyon meydana gelir. Ayrıca doğal polimerler aracılığıyla etkin maddenin salım hızının geciktirilmesi sağlanabilmektedir. İyonotropik jelasyon gibi yöntemler, hidrofilik polimer bazlı mikro/nanoparçacıkların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Calvo, Remunan-Lopez, Vila-Jato ve Alonso 1997).



Şekil 2.12. İyonotropik jelasyon yöntemi (Hemalatha ve diğerleri, 2011)

İyonotropik Jelasyon Yöntemini Etkileyen Faktörler

1) Polimer ve çapraz bağlayıcının konsantrasyonu

Polimer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun büyük etkisi vardır. Tutuklama verimi çapraz bağlayıcının türüne ve konsantrasyonuna göre değişkenlik gösterebilmektedir.

2) Sıcaklık

Sıcaklık, iyonotropik jelasyon yöntemiyle oluşturulan kürelerin boyutunda ve çapraz bağlanma süresinde önemli bir rol oynamaktadır.

3) Çapraz bağlama çözeltisinin pH'ı

Çapraz bağlama çözeltisinin pH'ı reaksiyon hızı, şekli ve kürelerin boyutu üzerinde etkili olduğu için formülasyon sırasında önemli bir faktör olduğu bilinmektedir.

4) İlaç konsantrasyonu

İlaç konsantrasyonu tutuklama verimini büyük ölçüde etkilediği için mikroküreler içine enkapsüle edilen ilaç miktarı kullanılan polimer ile uygun oranda olması gerekmektedir.

Eğer ilaç/polimer oranı, aralığı aşarsa, patlama etkisi (burst effect) gözlemlenebilmekte, kürelerin yoğunluğu artmakta, büyüklüğü ve şeklini de etkilemektedir (Patil, Chavanke ve Wagh, 2012).

2.4.4. Mikroküre hazırlanmasında kullanılan polimerler

Mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan polimerler yardımcı madde olarak önemli bir role sahiptirler. Polimerler biyolojik olarak bozunabilirliklerine göre biyobozunur ve biyobozunur olmayan polimerler olarak sınıflandırılmaktadır. Biyobozunur polimerler doğal polimerler ve sentetik polimerler olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Sentetik ve doğal biyobozunur polimerler, son yıllarda olumlu çevre etkileri ve sağlığın korunması ile ilgili alanlarda potansiyel uygulamaları nedeniyle çok daha fazla dikkat çekmiştir. Kimyasal bağın türü, pH, sıcaklık, kopolimer bileşimi ve hidrofilik özelliği polimerin bozunmasını etkileyen önemli özellikler arasında yer almaktadır (Bastioli, 2005). Son yıllarda biyobozunur polimerlere ilgi artmıştır. Biyobozunur malzemeler çoğunlukla tarımsal ve farmasötik uygulamalarda kullanılmaktadır. Sentetik polimerler biyomedikal implantlarda ve cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır çünkü çeşitli şekillerde üretilebilmektedirler (Siepmann, Siegel ve Rat, 2012). Doğal polimerler, proteinler ve polisakaritler olarak bitkilerde veya hayvanlarda bulunmaktadır. Doğal polimerlerin çoğu, suda çözünürdür ve suda çözünmeyen bir polimer ağından çapraz bağlanması gerekir. Çapraz bağlayıcının türü, doğal polimerler kullanılarak hazırlanan salım sistemlerinde ilacın salım oranını etkileyebilmektedir. Doğal polimerlerin en büyük avantajı biyolojik olarak uyumlu olmaları, toksik özellik göstermemeleri ve etken maddenin salımı bittikten sonra vücuttan uzaklaştırılmalarının gerekmemesidir (Srivastava ve diğerleri, 2016).

Biyobozunur polimerler;

- (i) iyi biyouyumluluk;
- (ii) kolay uygulama (örneğin, beyin dokusuna stereotaksik enjeksiyon),
- (iii) uzun süre boyunca kontrollü salım

gibi olumlu özelliklere sahiptirler (Sipos, 2008).

Çizelge 2.3. Biyolojik olarak çözünebilen polimerler (Siepmann , Siegel ve Rat, 2012).

Doğal polimerler	Sentetik polimerler
<u>Proteinler:</u> Kollajen, Jelatin, Albümin, Elastin, Fibrin	<u>Polyesterler:</u> Poli (glikolik asit), Poli (laktik asit)PLA Poli (laktik-glikolik asit), Poli (kaprolakton) (PCL)
<u>Polisakkaritler:</u> Kitosan, Dekstran, Aljinat, Hyaluronik Asit	Polianhidritler Polyortoesterler Poliüretanlar Tirozin türevi polikarbonatlar Polifosfatenler

Biyobozunur olmayan polimerler ise implante edilebilir ilaç dağıtım sistemleri, yapay kalp, implantlar (örneğin, kemik pimleri ve vidalar, mafsallı yüzey yapay derzlerde), kateterler, diyaliz tüpü, vasküler greft, enjekte edilebilir ilaç verme ve görüntüleme sistemleri, doku yenileyici membran ve gözenekli iskeleler ile birçok biyomedikal uygulama alanında yer bulmaktadır (Shastri, 2003). Güçlü ve hafif olması, ucuz olması, korozyona dayanıklı olması, vücut içinde değişime uğramayan inert yapıda olması ve kolayca kalıplanabilir veya şekillendirilebilir ve renklendirilebilir olması gibi birçok avantaja sahiptir ancak çevreye olumlu etkileri söz konusu değildir. Bu polimerler çevresel bozulmaya karşı dirençlidir. Bu nedenle atık şeklinde birikmektedir. Karbon ve Hidrojen atomlarından oluşan uzun zincirlere sahip olan polimerlerdir. Bu polimerlerin interatomik bağları çok güçlü ve katıdır, dolayısıyla bağlarını kırmaya ve sindirmeye çalışan mikroplara karşı dirençlilerdir.

Çizelge 2.4. Biyobozunur olmayan polimerler (Bhatia , 2016).

Biyobozunur olmayan polimerler
Silikon elastomerler Poli(etilen kovinil asetat) Poliakrilatlar (poli(metil metakrilat)) Poli(hidroksi etil metakrilat) Poli(N-vinil-2-pirolidon) Poli(N-izopropil akrilamid)

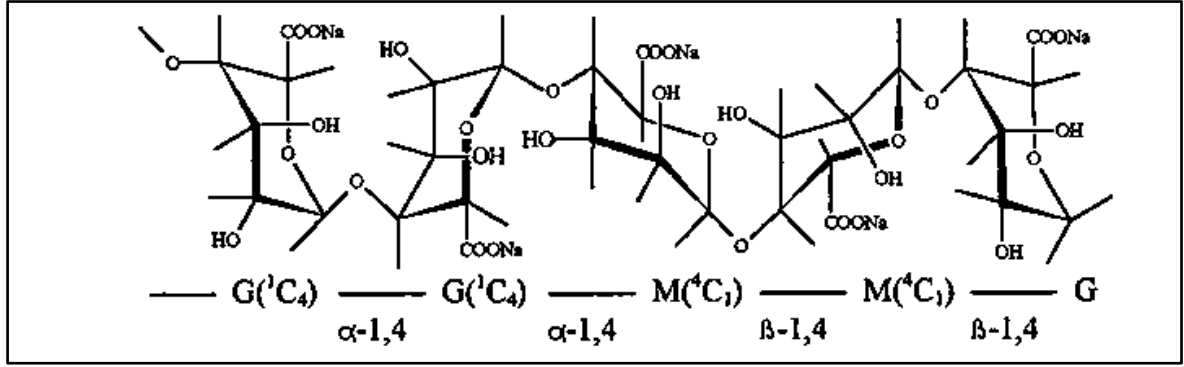
Çizelge 2.5. Doğal ve sentetik polimerlerin avantajları ve dezavantajları (Bhatia , 2016).

Doğal polimer	Sentetik polimer
<u>Avantajları</u> Düşük toksisite Biyouyumluluk Biyobozunur Kolayca elde edilebilir	<u>Avantajları</u> Biyouyumluluk
<u>Dezavantajları</u> Hayvansal kaynaklardan elde edilen doğal malzemelerde değişkenlik derecesi Yapısal olarak daha fazla karmaşık Ekstraksiyon işlemi çok karmaşık ve yüksek maliyetli	<u>Dezavantajları</u> Toksik Degrade değil Sentetik proses çok karmaşık ve yüksek maliyetli

2.5. Çalışma Kapsamında Kullanılan Destek Materyalleri

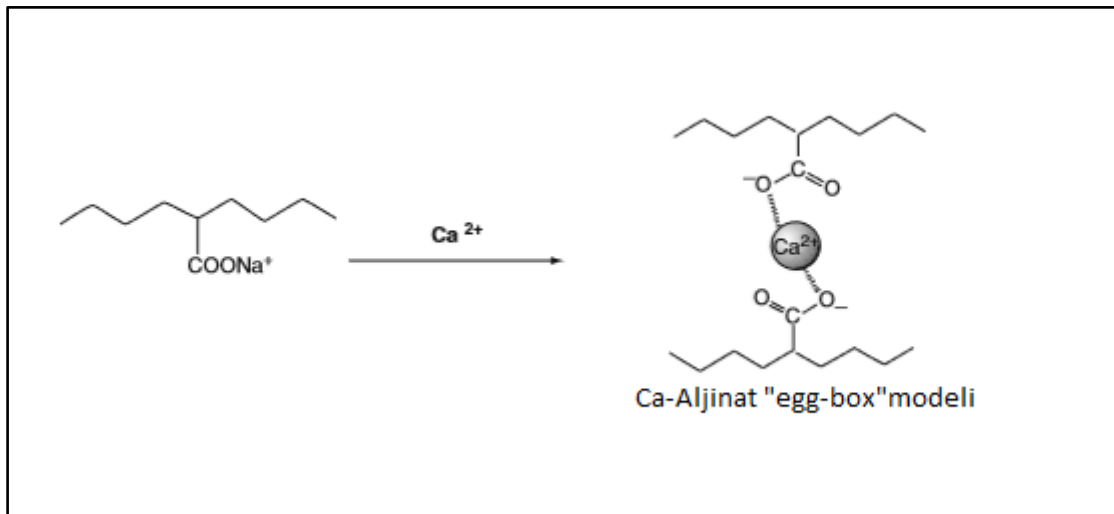
2.5.1. Sodyum aljinat

Aljinat, kahverengi deniz alglerinden elde edilen, polimerik yapıda bulunan toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, doğal olarak bulunabilen bir polisakkarittir. 1,4-bağlı β -D Mannuronik asit (M) ve α -D-gluronik asit (G) uzantılarından oluşan doğrusal dallanmamış polimerlerdir (Silva, Ribeiro, Figueiredo, Gonçalves ve Veiga, 2006).



Şekil 2.13. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı (Olatunji , 2016).

Aljinat molekülü, sıralı mannuronik asit (M) blokları, guluronik asit (G) blokları bölgeleri veya her ikisinin bir kombinasyonu ile oluşmaktadır. İki değerlikli ve çok değerlikli katyonlarla aljinatın kimyasal yapısında bulunan karboksilik gruplar etkileşime girmektedir (Reis ve Neves, 2008). Aljinatın en önemli özelliklerinden biri, Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonlarla etkileşime girerek çapraz bağlanmanın bir sonucu olarak jel oluşturma kabiliyetidir. Elde edilen jelin gücü, G blok içeriğine bağlıdır. M uzantıları, iki değerlikli iyonlar için zayıf bağları nedeniyle jel oluşumunda bu kadar önemli bir rol oynamaz. Ayrıca jel özellikleri hem M hem de G bloklarından ve bunların polimer içindeki oranlarından etkilenmektedir. Aljinat, düşük maliyetli olması, düşük toksisite göstermesi, biyouyumluluk ve jelleşme özelliği, sayesinde biyomedikal uygulamalarda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılan yardımcı maddelerden biri haline gelmiştir (Thakur ve Thakur , 2015).



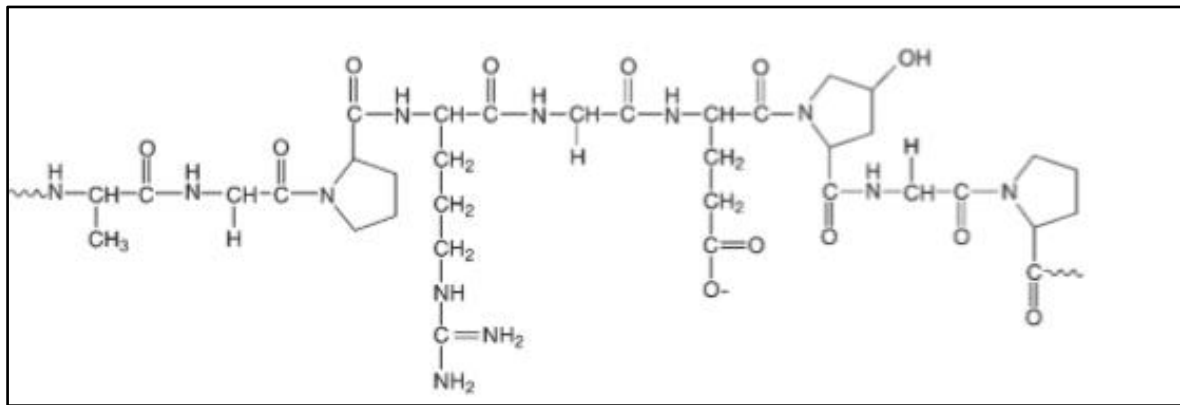
Şekil 2.14. Sodyum aljinatın Ca^{2+} ile çapraz bağlanması sonucu oluşan egg-box modeli (Rehm, 2009)

Sodyum aljinat, endüstrideki en yaygın kullanılan aljinat formudur, çünkü ilk algal saflaştırma yan ürünüdür. Sodyum aljinat, α (1 $\rightarrow$ 4) bağlı L-guluronik (G blokları) ve β (1 $\rightarrow$ 4) bağlı D-mannuronik asit (M blokları) ile alternatif guluronik ve mannuronik asitlerin segmentlerinden oluşur. Aljinatlar, ekstraksiyon kaynağına bağlı olarak değişen G ve M blok içeriğine sahip heterojen bir polimer ailesi olmasına rağmen, yüksek G içeriğine sahip aljinatlar, çok daha fazla endüstriyel öneme sahiptir (Olatunji , 2016).

2.5.2. Jelatin

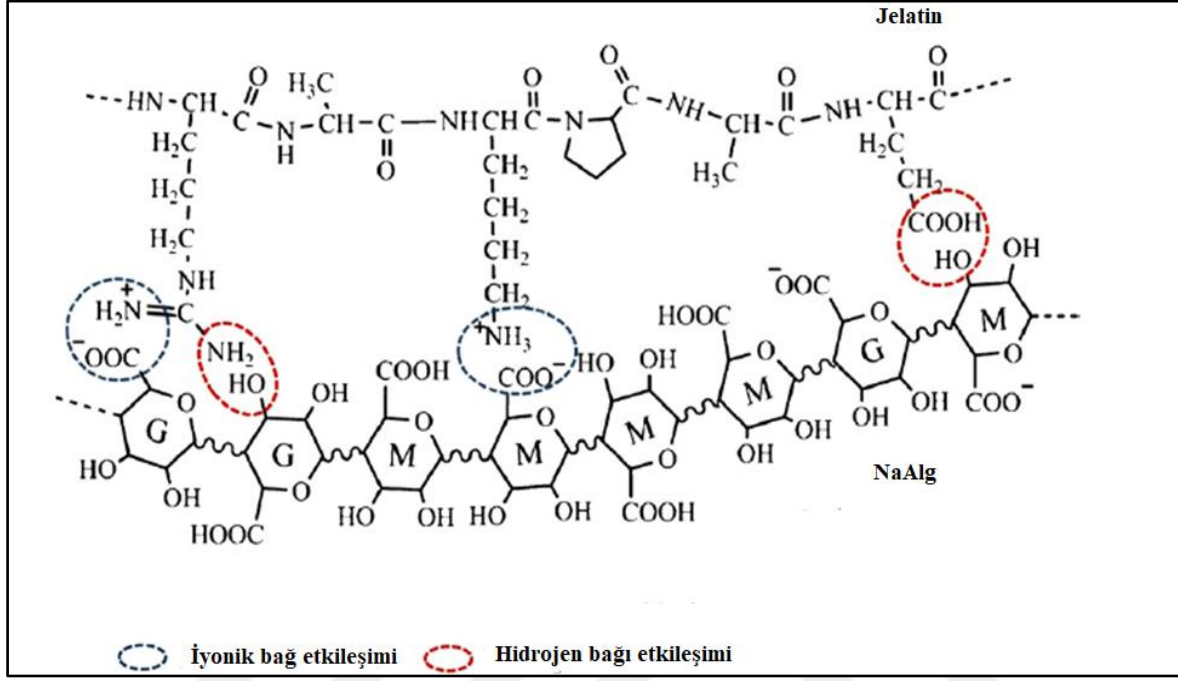
Saf bir protein besin maddesi olan Jelatin, deriden, beyaz bağ dokusundan ve hayvanların kemiklerinden elde edilen kollajenin, kısmi hidrolizi ile elde edilmektedir. Farmakoloji, medikal, kozmetik, gıda ve tarım uygulama alanlarında oldukça yaygın kullanılan bir biyopolimerdir. Jelatin, üstün fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı, farklı besin maddelerini farklı teknolojilerle kapsüllemek için kabuk malzemesi olarak kullanılmaktadır (Haug, 2011).

Jelatin % 50,5 karbon, % 25,2 oksijen, % 17 azot ve % 6,8 hidrojenenden oluşmaktadır. Asit hidrolizinden elde edilen Jelatin tip A ve bazik (alkali) hidrolizden elde edilen tip B olmak üzere iki tiptedir. Jelatinin özellikleri, elde edildiği ana kaynak ve ekstraksiyon yöntemine bağlıdır; Örneğin, yapılan araştırmalar sonucu böceklerden elde edilen Jelatinin ticari Jelatinden farklı özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir. Jelatin, viskoelastik özellikleri sebebiyle jelleştirici madde, kıvamlaştırıcı veya dengeleyici (stabilizatör) görevi görmektedir. Geri dönüşü olmayan şekilde hidrolize edilmiş bir kollajen türüdür. (Olatunji , 2016).

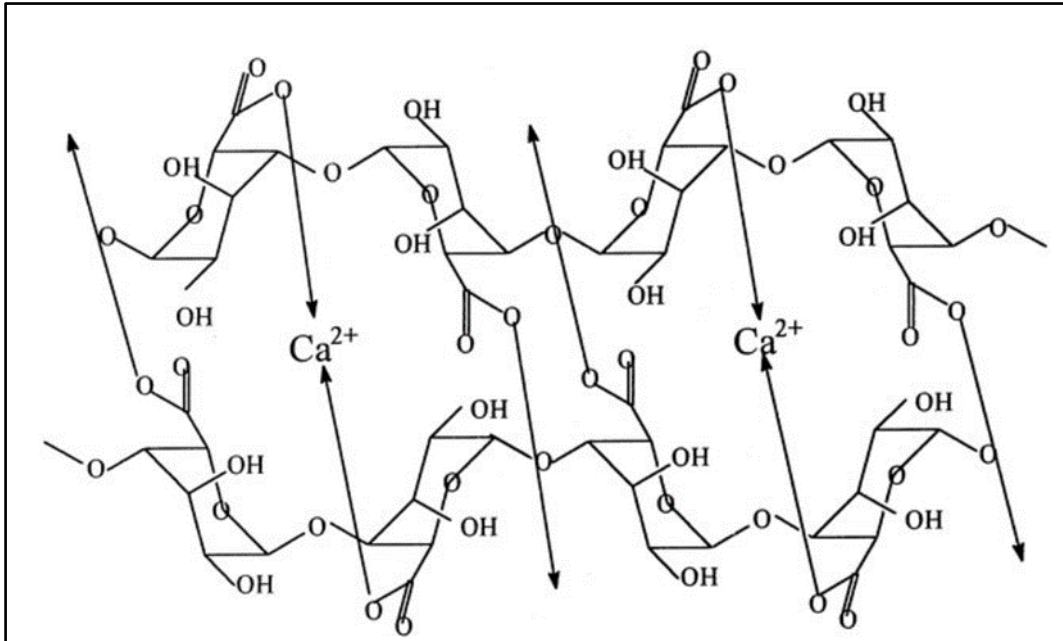


Şekil 2.15. Jelatinin kimyasal yapısı (Kommareddy, Shenoy ve M, 2005)

Jelatin, suda çözünür bir polimerdir. Hücre kültürü, doku mühendisliği ve terapötik ajanları taşıyan kontrollü salımlı tablet formülasyonlarında kullanımları ile öne çıkmaktadır (Kharkwal ve Janaswamy, 2017).



Şekil 2.16. NaAlg-Jelatin interaksyonu (Rehm, 2009)



Şekil 2.17. Sodyum aljinatın Ca^{2+} iyonu ile çapraz bağlanma yapısı (Rehm, 2009)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Solgar firmasından temin edilen, *Polygonum Cuspidatum*'dan elde edilmiş olan Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$) etken madde olarak kullanılmıştır. Küre hazırlanma aşamasında kullanılan dolgu maddesi polimerlerden Sodyum Aljinat ve Jelatin Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$) Merck'ten temin edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan Etanol ISOLAB Chemicals firmasından temin edilmiştir. Salım çalışmalarında faydalanan ve tampon çözeltisi hazırlanmasında kullanılan $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Carlo Erba Reagents firmasından temin edilmiştir. NaOH ve HCl Merck'ten alınmıştır. DPPH Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

UV spektrofotometresi: Hazırlanan mikrokürelerden salınan Resveratrol miktarı Rigol Ultra 3600 UV/Visible Spektrofotometresi kullanılarak 305 nm dalga boyundaki absorpsiyon pikinin şiddetinde tayin edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan resveratrolün, DPPH radikal temizleme aktivitesi Rigol Ultra 3600 UV/Visible Spektrofotometresi kullanılarak 517 nm dalga boyundaki absorpsiyon pikinin şiddetinde tayin edilmiştir.

FTIR spektrometresi: Hazırlanmış olan resveratrol yüklü NaAlg/Jelatin mikroküreleri ve boş NaAlg/Jelatin mikrokürelerinin kızılötesi spektrumları, Bruker VERTEX 80 FTIR spektrometresinde ATR aparatı kullanılarak, oda sıcaklığında orta infrared bölgesinde ölçülerek elde edilmiştir (Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) : Hazırlanmış olan resveratrol yüklü NaAlg/Jelatin mikroküreleri ve boş NaAlg/Jelatin mikrokürelerinin elektron mikrografları, vakum altında altın ile kaplandıktan sonra Quanta 400 F Field Emission model taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı).

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC): Mikrokürelerin ve polimerlerin DSC sonuçları Perkin Elmer DSC8000 marka Diferansiyel Taramalı Kalorimetre III kullanılarak elde edilmiştir.- 50 °C-300 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika ısıtma hızında deneyler yapılmıştır (ODTÜ Merkez Laboratuvarı).

XRD: Kristal malzemelerin karakterize edilmesi amacıyla Resveratrol, Resveratrol yüklü ve boş NaAlg/Jelatin mikrokürelerinin XRD sonuçları GNR-APD 2000 Pro X-Işını kırınımı (XRD) cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Tarama aralığı: 5-75°, tarama hızı 0.03 o/s , X-Işını Tüpü: Cu (kV: 40kV mA: 30mA, dalga boyu (CuK α) 1.5406 Å olarak belirlenmiştir (Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi).

Manyetik karıştırıcı: Mikroküre oluşum basamakları Biosan (Magnetic Stirrer MSH-300) manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlanmıştır.

Çalkalamalı su banyosu: Etken madde yüklü mikrokürelerin salım çalışmaları Medline BS-21 çalkalamalı su banyosu ile pH 1,2; pH 6,8; pH 7,4 tampon çözeltilerinde gerçekleştirilmiştir.

Etüv: Mikroküreler redLINE by BINDER marka etüv aracılığıyla kurutulmuştur.

pH metre: HACH HQ40d multi pHmetre ile tamapon çözelti değerleri ölçülmüştür.

Analitik terazi: RADWAG AS220.R2 marka analitik terazide tartımlar gerçekleştirilmiştir.

Enjeksiyon iğnesi: 5ml set inject marka plastik enjeksiyon iğnesi ile damlatma metoduyla küre dökülmüştür.

Agat havanı: Ezme işleminde kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

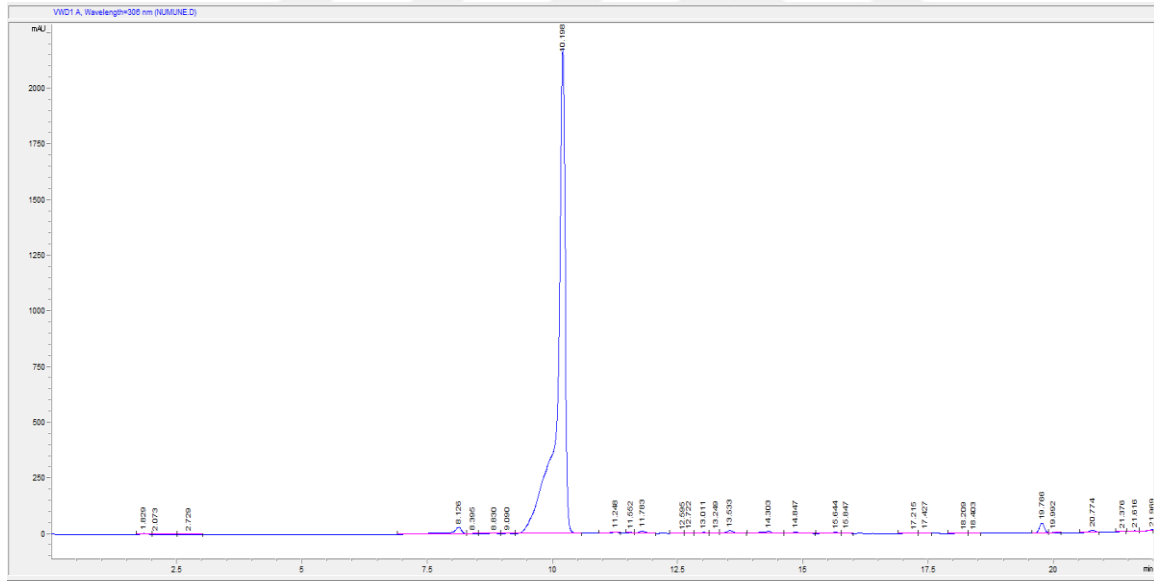
3.2.1. Resveratrolü HPLC ile saptama yöntemi

Trans-resveratrol' ün tayini için kullanılan HPLC analiz yöntemi aşağıda Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Analiz için gerekli absorbans değeri 306 nm dalga boyu olarak bulunmuştur.

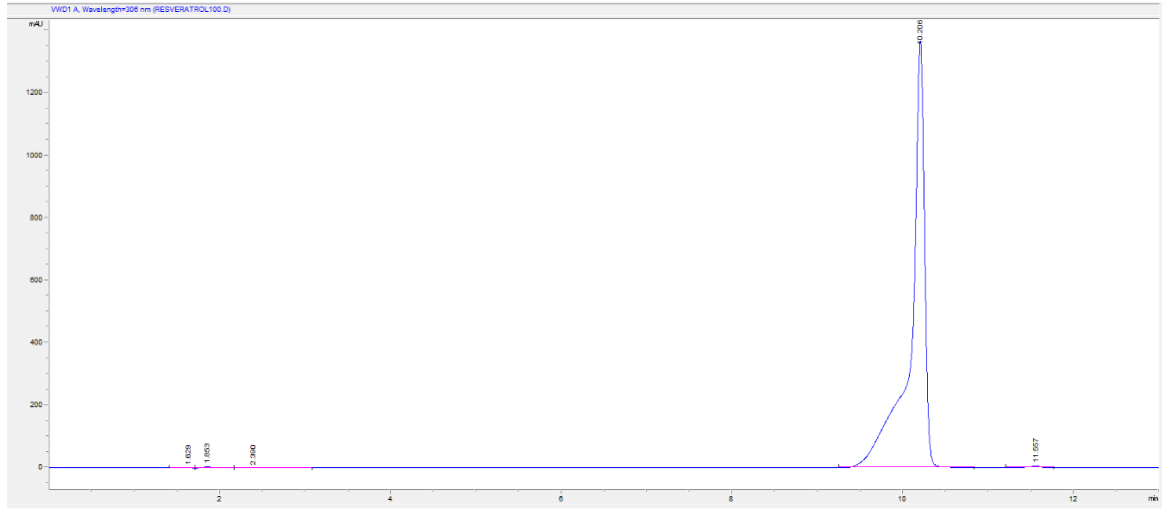
Sigma Aldrich firmasından temin edilen standart resveratrol ve mikroküre çalışmalarında kullanılan resveratrolün (*Polygonum cuspidatum*) miktarı tayinini yapmak ve doğrulamak amacıyla konsantrasyon ölçümleri, HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Resveratrol' ün miktar tayini için kullanılan HPLC analiz yöntemi

Mobil Faz	Methanol/Su (%63,4 / %36,6)
Enjeksiyon Miktarı	20µL
Akış Hızı	1 ml/dk
Kolon	Thermo Scientific C18 kolonu
Kolon Sıcaklığı	25°C
Dedektör	UV Dedektörü
Dalga Boyu	306 nm



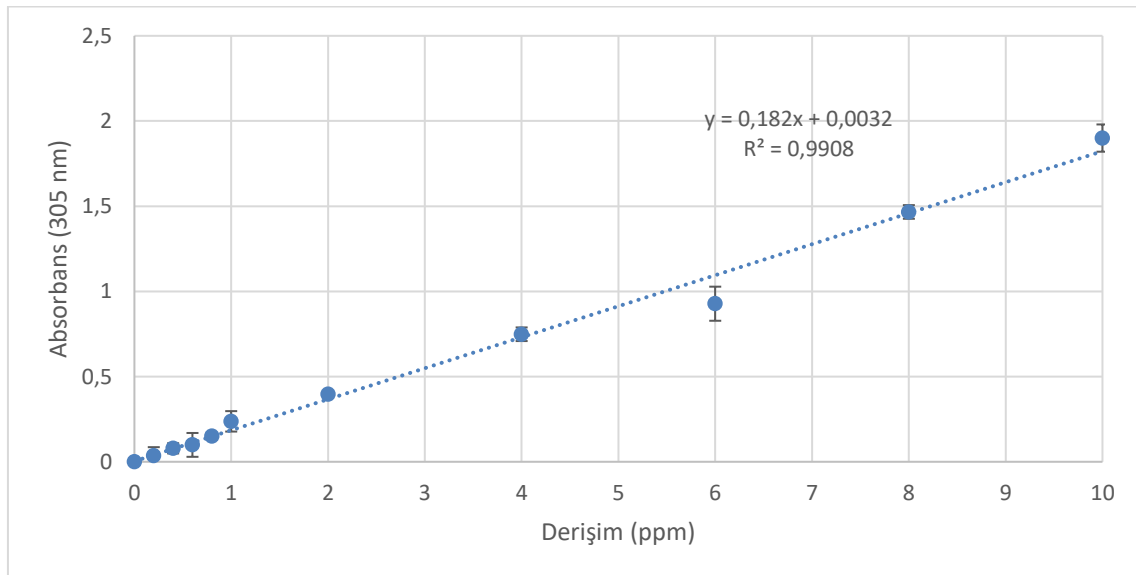
Şekil 3.1. Standart resveratrol HPLC kromatogramı



Şekil 3.2. Resveratrol (*Polygonum cuspidatum*) HPLC kromatogramı

3.2.2. Resveratrol kalibrasyon eğrisinin çıkarılması

Salım çalışmalarında yararlanmak üzere resveratrolün miktar tayinini yapmak için oluşturulan kalibrasyon eğrisi Rigol Ultra 3600 UV/Visible Spektrofotometresi kullanılarak 305 nm dalga boyunda farklı derişimleri ölçülerek elde edilmiştir. Ölçüm için resveratrolün etanolde çözülmesi sebebiyle çözücü ortamı etanol seçilmiştir. Şekil 3.3'te kalibrasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 3.3. Resveratrol kalibrasyon grafiği (UV vis-spektrofotometre)

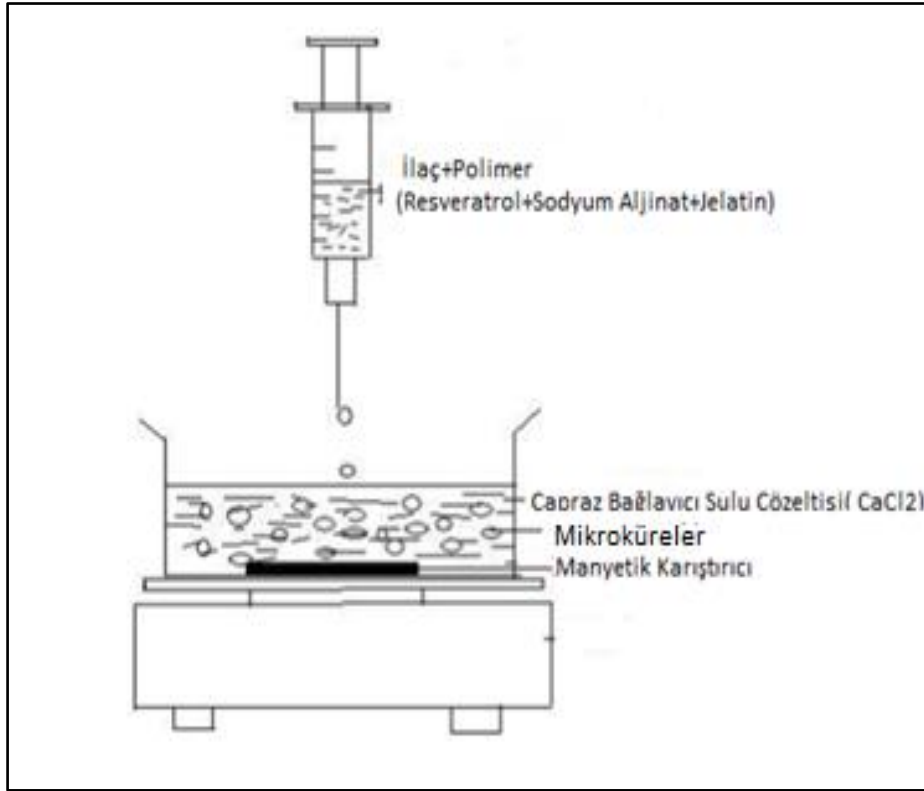
3.2.3. Resveratrol yüklü mikrokürelerin hazırlanması

Resveratrol yüklü küreler iyonotropik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Destek maddesi olarak kullanılan polimerler NaAlg %2 (w/w), Jelatin %2 (w/w)'lik derişimlerde saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Resveratrol yüklü mikrokürelerin hazırlanma koşulları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Çizelge 3.2'de verilen farklı polimer oranlarındaki karışımların içine yine farklı etken madde/polimer (w/w) oranlarında resveratrol ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti 24 saat süre ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak etken madde, polimer çözeltisi içerisinde dağıtılmıştır.

Elde edilen süspansiyonun tamamı 5 ml'lik enjeksiyon iğnesi yardımıyla damlalar halinde 90 mL çapraz bağlama çözeltisine (CaCl_2) damlatılmıştır. Manyetik karıştırıcı 5000 rpm karıştırma hızında karıştırılarak mikrokürelerin çözelti ile teması sağlanmıştır.

Çapraz bağlayıcı çözeltisine son damlanın düşmesinden itibaren küreler çapraz bağlanma çözeltisinde 30 ve 45 dakika süre ile bekletilmiştir. Çapraz bağlama süreci sonucu oluşan mikroküreler, süzgeç kağıdı yardımıyla süzölmüştür ve saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan küreler 40 °C etüve alınarak 1 hafta bekletilerek kurutulmuş ve daha sonra sabit tartıma getirilmiştir.

Mikroküre hazırlama sistemi Şekil 3.4.'de gösterilmiştir. Etken madde/polimer oranları, polimer/polimer oranları, çapraz bağlama çözeltisinin derişimi ve çapraz bağlanma süresi değiştirilerek farklı formölasyonlarda mikroküreler hazırlanmıştır. Ayrıca, sadece NaAlg ve Jelatin/NaAlg polimerleri karışımında etken madde olmaksızın hazırlanan boş kürelerin hazırlama koşulları ve uygulanan formölasyonlar Çizelge 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Mikroküre hazırlama sistemi

Çizelge 3.2. Resveratrol yüklü mikrokürelerin hazırlanma koşulları

No	Polimer Oranı (Jelatin/NaAlg)	Etken Madde/Polimer Oranı (w/w)	Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcı Derişimi	Çapraz Bağlama Süresi (dk.)
A1	NaAlg	1/2	CaCl ₂	0,5 M	30
A2	NaAlg	1/4	CaCl ₂	0,5 M	30
A3	NaAlg	1/8	CaCl ₂	0,5 M	30
A4	NaAlg	1/2	CaCl ₂	1 M	30
A5	NaAlg	1/2	CaCl ₂	1 M	45
B1	1/1	1/4	CaCl ₂	1 M	30
B2	1/1	1/4	CaCl ₂	1 M	90
B3	1/1	1/2	CaCl ₂	1 M	30
B4	1/1	1/2	CaCl ₂	1M	45
C1	1/2	1/4	CaCl ₂	1 M	30
C2	1/2	1/2	CaCl ₂	1 M	45
C3	1/2	1/2	CaCl ₂	1 M	30
D1	2/1	1/4	CaCl ₂	1 M	30
D2	2/1	1/2	CaCl ₂	1 M	30
D3	2/1	1/2	CaCl ₂	1M	45

Çizelge 3.3. Boş mikrokürelerin hazırlanma koşulları

No	Polimer Oranı (Jelatin/NaAlg)	Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcı Derişimi (M)	Çapraz Bağlama Süresi (dak)
A4b	NaAlg	CaCl ₂	1M	30
A5b	NaAlg	CaCl ₂	1M	45
B3b	1/1	CaCl ₂	1M	30
B4b	1/1	CaCl ₂	1M	45
C1b	1/2	CaCl ₂	1M	30
D2b	2/1	CaCl ₂	1M	30

b:Her bir formülasyon için boş küre numunesini ifade etmektedir.

3.2.4. Resveratrol yüklü mikrokürelerden salım çalışmaları

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan resveratrol yüklü mikrokürelerden salınan etken madde oranını ölçmek için 10 mg etken madde içeren mikroküre örnekleri, 50 ml salım ortamı içeren cam kaplar içerisine konularak çalkalamalı su banyosununa yerleştirilmiştir. Salım çalışmaları 37°C’de ikişer saat süre ile sırasıyla daha önce hazırlanmış olan pH 1,2; pH 6,8; pH 7,4 tampon çözeltilerinde gerçekleştirilmiştir. pH 1,2 tampon çözeltisi saf su ve HCl, pH 6,8 ve pH 7,4 tampon çözeltileri su , NaH₂PO₄.2H₂O ve Na₂HPO₄.2H₂O yardımıyla hazırlanmıştır. İlk iki saat pH 1,2 salım ortamında 5.dk, 15.dk, 45.dk ve 60.dk’da, sonrasında pH 6,8 ve pH 7,4 salım ortamlarından yarım saat arayla 5’er ml örnekler alınmıştır ve yerine 5’er ml salım ortamı ilave edilmiştir. 2 saat süre sonunda mikroküreler süzülerek bir sonraki pH daki tampon çözeltiye aktarılmıştır. Mikrokürelerden salınan resveratrol miktarını belirlemek için salım ortamından alınan 5 ml’lik örneklerin UV-VIS spektrofotometresi ile 305 nm’de absorbans değerleri belirlenmiştir. Daha sonra kalibrasyon grafiğinden elde ettiğimiz denklem kullanılarak derişimler hesaplanmıştır.

3.2.5. Mikrokürelerin denge su içeriklerinin tayini

Boş mikrokürelerin şişme kapasitelerini belirlemek amacıyla sabit tartıma gelen 50 mg mikroküre örnekleri 50 mL saf su ve pH 1,2; 6,8; 7,4 tampon çözeltileri içerisinde oda sıcaklığında 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda mikrokürelerin yüzey suyu uzaklaştırılmış ve sonrasında tartılmıştır. Boş mikrokürelerin denge su içeriklerinin hesaplanması için aşağıda sunulan eşitlik kullanılmıştır. % Denge su içerik değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

$$\% \text{ Denge su içeriği (w/w)} = \frac{(W_s - W_k)}{W_k} \times 100 \quad (3.1)$$

Ws : Şişmiş mikrokürelerin kütlesi, Wk : Kuru mikrokürelerin kütlesi

3.2.6. Tutuklama verimi (TV) tayini

Teorik olarak yüklenmesi gereken toplam ilacın gerçekte ne kadar yüklendiğini belirlemek için yapılan hesaplama tutuklama verimi (TV) denir. Elde edilen etken madde yüklü mikrokürelerden 50 mg alınarak agat havanında ezilmiş ve 37°C’de çalkamalı su banyosunda 2 saat ve 4 saat süre ile 50 mL salım ortamında (etanol) bekletilmiştir. Elde edilen çözelti süzülüş ve tutuklanan etken madde miktarı UV-Vis spektrofotometresi ile 305 nm’de ölçülerek tutuklama verimi hesaplanmıştır. Mikrokürelerin tutuklama verimleri aşağıda yer alan eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\%TV = \frac{\text{Deneyisel İlaç Miktarı}}{\text{Teorik İlaç Miktarı}} \times 100 \quad (3.2)$$

Deneyisel İlaç Miktarı: Gerçekte mikrokürelerin içinde bulunan ilaç miktarı (mg),

Teorik İlaç Miktarı: Teorik olarak mikrokürelerin içinde bulunan ilaç miktarı (mg)’dır.

3.2.7. Karakterizasyon çalışmaları

FTIR ve XRD karakterizasyon çalışmaları Gazi Üniversitesi fotonik uygulama ve araştırma merkezinde, DSC ve SEM karakterizasyon çalışmaları ODTÜ merkez laboratuvarında yapılmıştır.

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) termogramları

DSC, genellikle mikrokürenin ve saf etkin madde numunelerinin termal ısıya maruz kalması sırasında meydana gelen değişiklikleri karakterize etmek için uygulanan bir yöntemdir (Basu ve Adhiyaman, 2008). Polimer araştırmalarında camsı geçiş sıcaklığı (T_g), erime / yeniden kristalleşme sıcaklığı (T_m / T_c) ve kür ölçümlerinin yapılması olmak üzere üç farklı amaçla kullanılmaktadır (Groenewoud, 2001). DSC aracılığıyla resveratrolün erime sıcaklığında termal ısı tayini yaparak mikroküre numunelerinin termal özellikleri belirlenebilmektedir. Çalışma kapsamında deneyler $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızında yapılmıştır.

FTIR spektrumu

Kızılötesi spektroskopisi, molekülün kimyasal yapısını tanımlama imkânı sağlayan en güçlü analitik yöntemlerden biridir. FTIR, bir kimyasal maddenin, kızılötesi bölgede seçici bir absorpsiyon göstermesi olayıdır (Sekhar, 2014). Mikrokürelerinin kızılötesi spektrumları, Bruker VERTEX 80 FTIR spektrometresinde ATR aparatı kullanılarak, oda sıcaklığında orta infrared bölgesinde ölçülerek elde edilmiştir.

Taramalı elektron mikrografı (SEM)

Taramalı elektron mikrografı (SEM), resveratrol yüklü küreleri karakterize etmek için kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu teknik, örnek yüzeylerinden yayılan yüksek çözünürlüklü, yüksek büyütme oranlı görüntüleri toplamak için dar bir elektron ışını uygulama prensibine dayanmaktadır (Carter ve Shieh, 2015). Mikrokürelerinin elektron mikrogramları, vakum altında altın ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınmıştır. Resveratrol yüklü ve boş mikrokürelerin 50x, 100x, 200x ve 1000 büyütme elektron mikrogramları alınmıştır.

X-ışını kırınımı (XRD) eğrileri

X-ışını kırınımı (XRD), kristal malzemelerin karakterize edilmesi için uygulanan bir tekniktir. Kristal fazların tiplerini ve doğasını, kristallik derecesini, amorf yapısına ilişkin bilgiler sağlamaktadır. Çalışma kapsamında tarama aralığı: 5-75°, tarama hızı 0.03 o/s , X-Işını Tüpü: Cu (kV: 40kV mA: 30mA, dalgaboyu (CuK α) 1.5406 Å olarak belirlenmiştir.

3.2.8. Antioksidan aktivite tayini

Literatürde yer alan birçok çalışmada, resveratrolün yüksek antioksidan aktivite gösterdiği vurgulanmıştır. Resveratrolün klasik radikal temizleme yöntemi olan DPPH ile antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Sigma-Aldrich firmasından temin edilen DPPH radikali ile hazırlanan çözelti kullanılmıştır.

DPPH (1,1-difenil -2-pikrilhidrazil) radikal temizleme aktivitesi tayini

Çalışma kapsamında DPPH stok çözeltisi, 5 mg DPPH, 100 mL etanol içinde çözülerek hazırlanmıştır. Ayrıca, resveratrol numunesinin (*Polygonum cuspidatum*) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltisinden 1:10 oranında seyreltilerek 3 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve her bir konsantrasyonun üç tekrar ölçümü yapılacak şekilde deney tüplerine aktarılmıştır. Homojen bir şekilde karışması için pipetleme yapılmıştır ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Aynı işlemler en iyi oran olarak belirlenen 1/1 oranda resveratrol yüklü mikroküre ve boş küreler için tekrarlanmıştır. 1400 μ L DPPH çözeltisi üzerine tüplerden aldığımız numune çözeltileri (100 μ L) aktarılmıştır. Elde edilen karışımlar homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra UV-Vis spektrofotometre aracılığıyla DPPH'ın maksimum absorbens gösterdiği 517 nm'de ölçülmüştür. Ölçüm sonrası elde ettiğimiz absorbens değerleri ile kalibrasyon grafiği çıkarılarak IC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplanmıştır. IC₅₀, başlangıçtaki DPPH konsantrasyonu yani radikal miktarını/absorbansını yarıya indiren numune (antioksidan) konsantrasyonudur. Mikrokürelerin ve resveratrol numunesinin % DPPH radikal temizleme aktivitesi aşağıda yer alan eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$(\%) \text{ DPPH radikal temizleme aktivitesi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

(3.3)

Akontrol: Kontrol örneğinin (DPPH çözeltisi) absorbans değeri

Anumune: Belirli konsantrasyondaki bileşik ve DPPH çözeltisi karışımının absorbans değeridir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

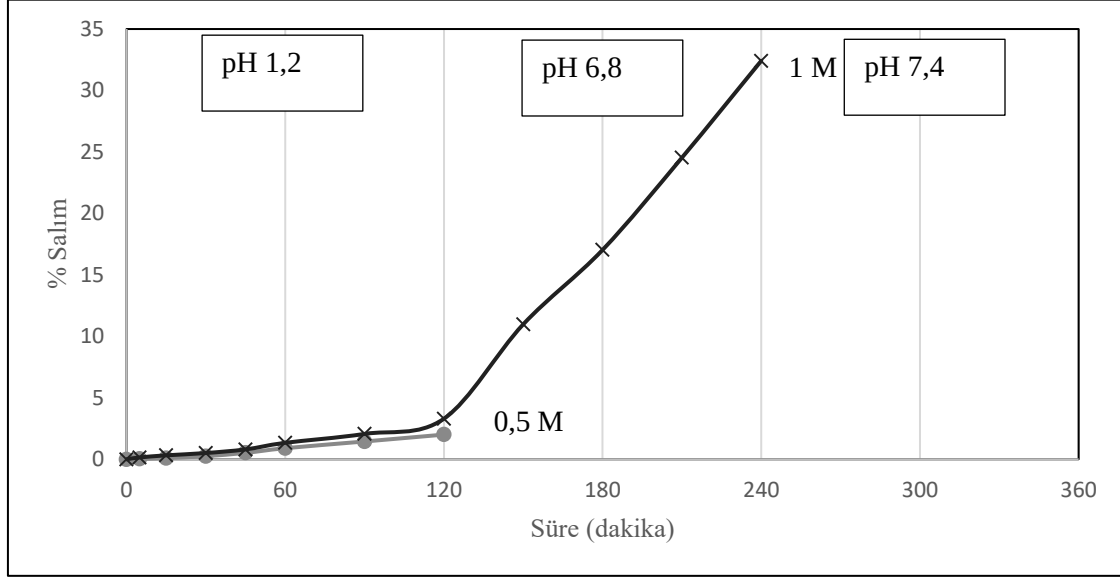
Bu çalışmada, Resveratrol yüklü mikrokürelerin hazırlanması amacı ile kaplayıcı madde olarak NaAlg ve Jelatin kullanılmıştır. Enkapsülasyon yöntemi olarak iyonotropik jelasyon yöntemi seçilmiştir. Araştırmanın amacına göre primer sonlanım noktaları farklılıkları ile birlikte yaptığım literatür taramalarında uygulanan resveratrolün minimum dozu 1 mg, maksimum dozu 3500 mg olduğu, sıklıkla 50-250 mg aralığının tercih edildiği görülmektedir (Pannu ve Bhatnagar, 2019; Gambini ve diğerleri, 2015). İstenilen düzeyde etki görülen konsantrasyonların ırk farklılıklarına ve vücudun sağlık-hastalık durumlarına göre değişkenlik göstermesinden kaynaklı optimum konsantrasyon belirlenememektedir. Buna bağlı olarak çalışmamızda farklı oranlarda etken madde çalışılmış ancak en iyi profil 100 mg'da gözlenmiştir ve etken madde oranı 100 mg'da sabit tutularak farklı polimer/polimer oranlarında mikroküreler elde edilmiştir. Hazırlama koşulları ve bileşimleri değiştirilerek hazırlanan kürelerin etken madde salım değerleri, denge su içerikleri, içerdikleri etken madde miktarları incelenmiştir. Resveratrol salım hızları mide, bağırsak giriş ve bağırsak çıkış pH'ındaki salım oranlarına göre incelenmiştir. En iyi salım profilini oluşturan mikroküreler SEM, DSC, FTIR ve XRD ile karakterize edilmiştir. Antioksidan aktivitesine DPPH yöntemi ile bakılmıştır.

4.1. Resveratrolün Jelatin/NaAlg Mikrokürelerden Kontrollü Salımı

4.1.1. Çapraz bağlayıcı derişiminin resveratrol salımı üzerine etkisi

Çapraz bağlayıcı derişiminin NaAlg kullanılarak hazırlanan mikrokürelerden resveratrol salımı etkisini incelemek amacıyla CaCl_2 derişimi 0,5 M ve 1 M olmak üzere iki farklı çapraz bağlayıcı derişiminde mikroküreler oluşturulmuş ve bu mikrokürelerin resveratrol salımı incelenmiştir. Çapraz bağlayıcı derişiminin 0,5M'den 1M'a çıkarılmasıyla ilacın tutuklama veriminin ve salımının arttığı görülmüştür. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmıştır. Mandal ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, CaCl_2 derişimini 0.1 M'dan 0.27 M'a yükselttiğinde ilacın tutuklama veriminin % 53'lerden % 62 lere çıktığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca Cho ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada da aynı durum görülmüştür (Cho ve diğerleri, 2014; Mandal, Kumar, Krishnamoorthy ve Basu, 2010).

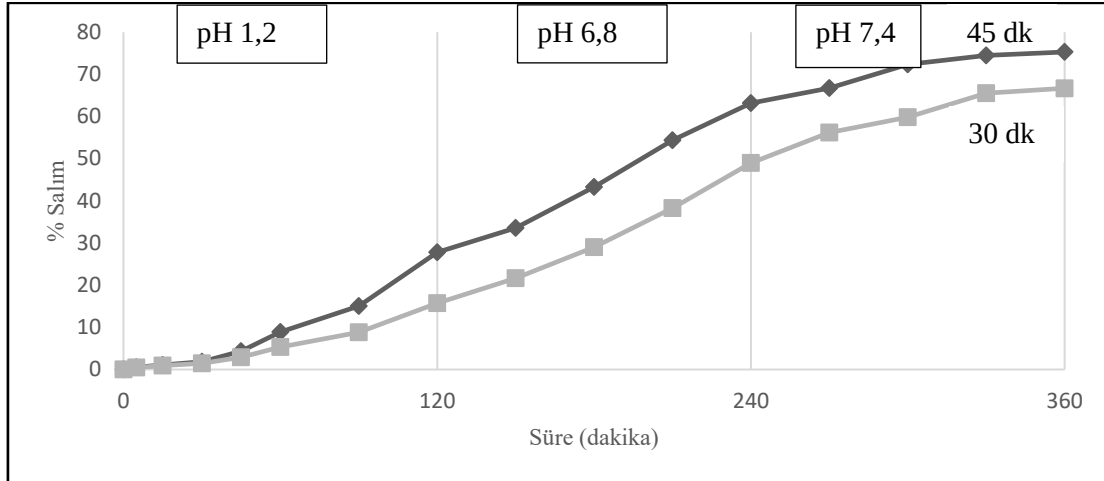
Ayrıca, 0,5 M çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan resveratrol yüklü NaAlg mikroküreler pH 1,2 mide salım ortamından pH 6,8' e aktarıldığında bozunmuştur. Ancak 1M çapraz bağlayıcıya maruz bırakılan NaAlg mikrokürelerin salım profili pH 7,4' e kadar incelenmiş pH 7,4 salım ortamına aktarılamamıştır.



Şekil 4.1. NaAlg mikrokürelerde çapraz bağlayıcı derişiminin resveratrol salımı üzerine etkisi (o: 0,5 M, x:1 M).

4.1.2. Jelatin/NaAlg çapraz bağlama süresinin ve pH'nın resveratrol salımı üzerine etkisi

En etkin salım profilini gözlemlemek için ortaya çıkan alternatiflerden birisi de elde edilen mikroküreleri çeşitli sürelerde çapraz bağlayıcı çözeltilere maruz bırakmaktır. Çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisini incelemek amacıyla 1/1 Jelatin/NaAlg oranına sahip mikroküre oluşturularak salım profili incelenmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi mikrokürelerin CaCl_2 ile çapraz bağlama süresi arttıkça salım artmaktadır. Çapraz bağlama süresi arttıkça daha fazla ilacı tutuklayabilmekte ve bu durumun da salım miktarını arttırmakta olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.2. Jelatin/ NaAlg mikrokürelerde çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisi (◇:1/1-45 dk, □:1/1-30 dk,).

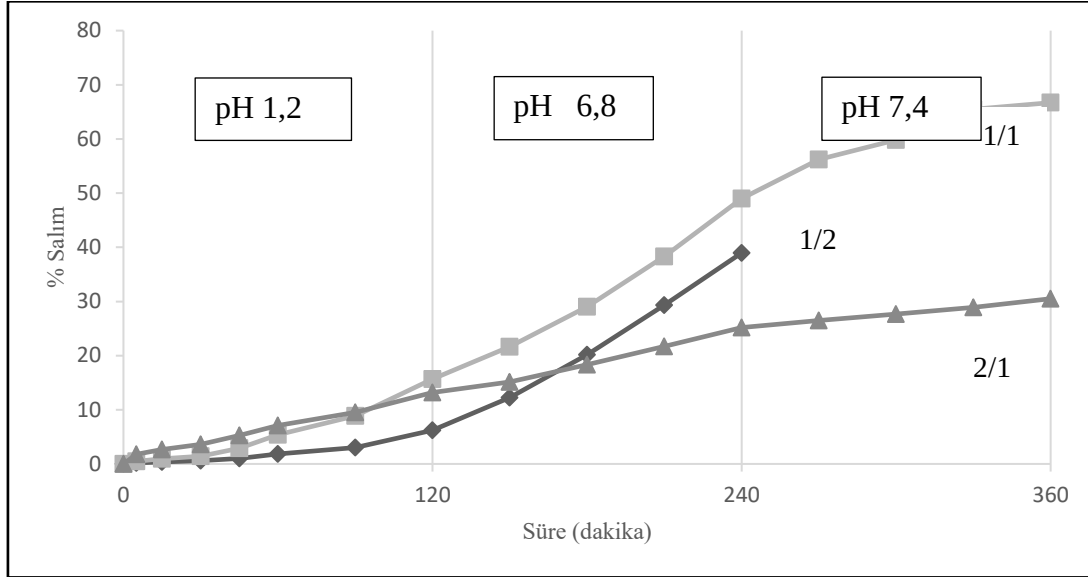
Ayrıca hazırlanan tüm mikroküre formülasyonları sırasıyla pH 1,2; pH 6,8 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde 2'şer saat süreyle salıma bırakılmıştır. Salım profilleri incelendiğinde pH 1,2'de salımın daha yavaş ve az olduğu görülmüştür. pH 6,8'de ise salımın artan bir eğri sergilediği gözlenmiştir. pH 7,4'de ise en yüksek salım profiline ulaşmıştır. pH 1,2'de göstermiş olduğu yavaş salımın sebebinin mide asidik ortamı olması ve NaAlg'ın asidik ortamlarda az şişme özelliği göstermesinden kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca salım ortamının pH'ının artmasıyla salım oranının artması, aljinatın karboksilik gruplarının iyonlaşma derecesinin artmasına bağlı olduğu görülmüştür (Roy, Bajpai ve Bajpai 2009).

4.1.3. Jelatin/NaAlg mikrokürelerde polimer/polimer oranı değişiminin salım üzerine etkisi

Resveratrolün salım profilini iyileştirmek ve salımını arttırmak amacıyla aljinat esaslı mikrokürelerin yanı sıra farklı konsantrasyonlarda resveratrol yüklü Jelatin/NaAlg mikroküreler hazırlanmıştır. Bu formülasyonların salım profilleri incelenmiştir.

1/1, 1/2 ve 2/1 Jelatin/NaAlg oranlarında mikroküreler oluşturulmuş ve salıma etkisi incelenmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi polimer/polimer oranı 1/1 olan mikrokürelerden resveratrol salımı diğer oranlara karşılaştırıldığında daha kontrollü ilerlemiştir. Ortama Jelatin ilavesiyle ortam yoğunluğunun artmasının, salımın daha uzun sürede gerçekleşmesine yol açtığı değerlendirilmiştir. Benzer şekilde Roy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucumuzu destekler niteliktedir. Endosulfan yüklü NaAlg/Jelatin

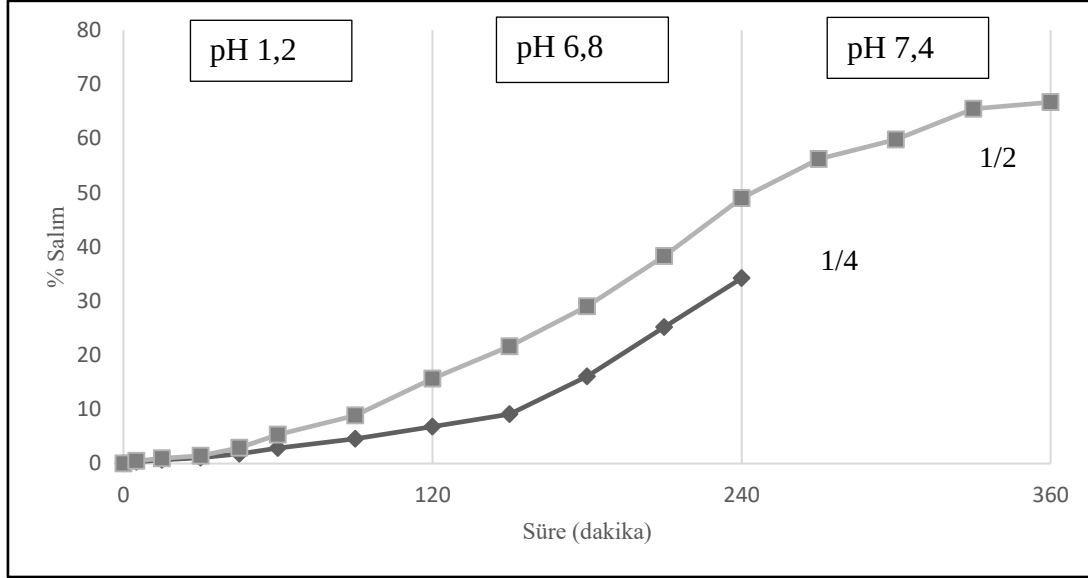
mikroküreler hazırlanmış en iyi salım profilini 1/1 oranda olan blend kürelerde (iki farklı polimer karışımı küreler) görülmüştür.



Şekil 4.3. Jelatin/ NaAlg mikrokürelerde polimer/polimer oranının salım üzerine etkisi (Δ :2/1, $\diamond$:1/2, $\square$:1/1).

4.1.4. Jelatin/NaAlg mikrokürelerde etken madde/polimer oranı değişiminin salım üzerine etkisi

Blend mikrokürelerdeki etken madde/polimer oranının değişimiyle elde edilen salım profili değişimi Şekil 4.4'de yer almaktadır. Etken madde/polimer oranının 1/4'ten, 1/2'e çıkarılmasıyla resveratrol hapsedilen mikrokürelerin salımında artış olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan iki etken madde/polimer oranında en yüksek resveratrol salımının 1/2 etken madde/polimer formülasyonlu mikrokürelerde % 66,7 olarak bulunmuştur. Literatürde benzer şekilde sonuçlar bildirilmiştir. Etken madde yükleme miktarının artmasıyla salım miktarının arttığı gösterilmiştir. Bu durumun sebebinin etken maddenin kürelere yüklenmesinin artmasıyla, çözücü cephenin yüklü tanelerin yüzeyine daha hızlı ilerlemesi ve dolayısıyla daha büyük bir salımla sonuçlanmasıyla açıklanmıştır (Bajpai, 2004; Roy ve diğerleri, 2009)



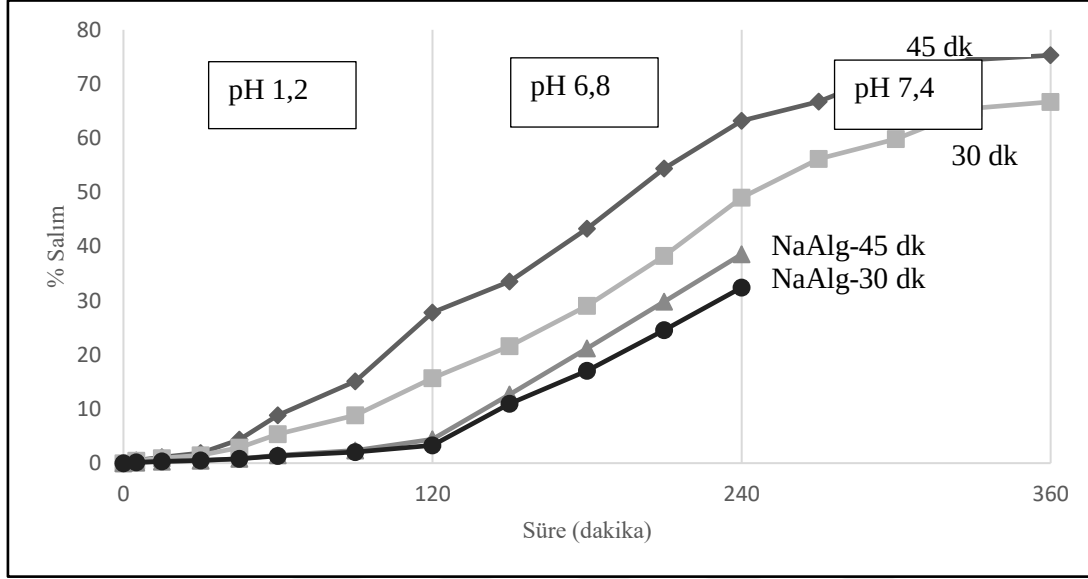
Şekil 4.4. Jelatin/ NaAlg mikrokürelerde etken madde/polimer oranının salım üzerine etkisi (□:1/2, ◇:1/4, Ç.S:30 dak.).

4.1.5. NaAlg ve blend mikrokürelerde çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisi

Şekil 4.5'te etken madde/polimer oranı 1/2, çapraz bağlayıcı derişimi 1M ve çapraz bağlama süresi 30 dk ve 45 dk olan koşullarda hazırlanan NaAlg ve Jelatin/NaAlg mikrokürelerin salım profilleri karşılaştırılmıştır. NaAlg mikrokürelerden ve Jelatin/NaAlg oranı 1/1 olan mikrokürelerden en yüksek etken madde salımı 45 dakika süreyle çapraz bağlanan mikrokürelerde gözlenmiştir. Jelatin/NaAlg ile hazırlanan mikrokürelerden salımın diğer formülasyonlara göre en etkin profilini sergilediği daha yavaş ve kontrollü gerçekleştiği, NaAlg kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin ise pH 1,2'de yavaş salım, pH 6,4 salım ortamına alındığında ise aniden hızlı bir salım profili gösterdiği görülmektedir. 4.saat sonunda ise bozunma gerçekleştiği görülmüştür. NaAlg ile hazırlanan mikroküreler pH 7,4'de bozunduğundan salım pH 6,8' e kadar devam ettirilebilmiştir. Jelatin/NaAlg oranı 1/1 olan mikrokürelerin ise tüm pH salım ortamlarında bozunmadan 6 saat boyunca salım profili izlenebilmiştir.

Almeida tarafından yapılan benzer bir çalışmada, sadece kalsiyum aljinatla hazırlanan mikrokürelerin ilacın enkapsüle edilmesinde yetersiz olduğu ve ilacın 6. saatin sonunda tamamen serbest bırakıldığı belirtilmiştir. Ancak formülasyona bir çapraz bağlama maddesi daha eklendiğinde, polimer zincirleri arasında bağı kuvvetlendirmiş ve salım davranışı değiştiği görülmüştür. Ayrıca, mide asidik ortamında aljinik asit çökmesinden dolayı aljinat

matrislerinin daha az şişme ve aşınma görüleceği belirtilmiştir. Şişme sürecinin bir kalsiyum tutucu olarak işlev gören fosfat iyonunun varlığı ile daha da arttığı, pH 7.4'e daldırıldığında, aljinat-Jelatin kürelerinin hemen şişmeye başladığı rapor edilmiştir (Almeida, 2004).



Şekil 4.5. NaAlg ve Jelatin/ NaAlg mikrokürelerinden kümülatif salım profili (Δ: NaAlg-45 dk, o: NaAlg-30 dk, ◇:1/1-45 dk, □:1/1-30 dk.).

4.2. Boş Mikrokürelerin Denge Şişme Değerleri

Farklı formülasyonlarda hazırlanan boş mikrokürelerin saf su ve pH 1,2; pH 6,8 ve pH 7,4'te % şişme değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. NaAlg mikroküreler pH:7,4 fosfat tamponunda parçalanmaktadır. Tablodan da anlaşılabileceği üzere pH arttıkça % şişme değeri artmakta ve en yüksek şişme değeri pH 7,4'de görülmektedir. En az şişme oranının saf sudan sonra pH 1,2'de görülme sebebinin midenin asidik ortam olması ve NaAlg'ın asidik ortamlarda az şişme özelliği göstermesinden kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca farklı formülasyonlarda hazırlanan Jelatin/NaAlg mikrokürelerin şişme değerlerinin NaAlg miktarı arttıkça pH=6,8 ve pH=7,4'de bozunma görülmektedir. Bu durum salım sonuçlarını desteklemektedir.

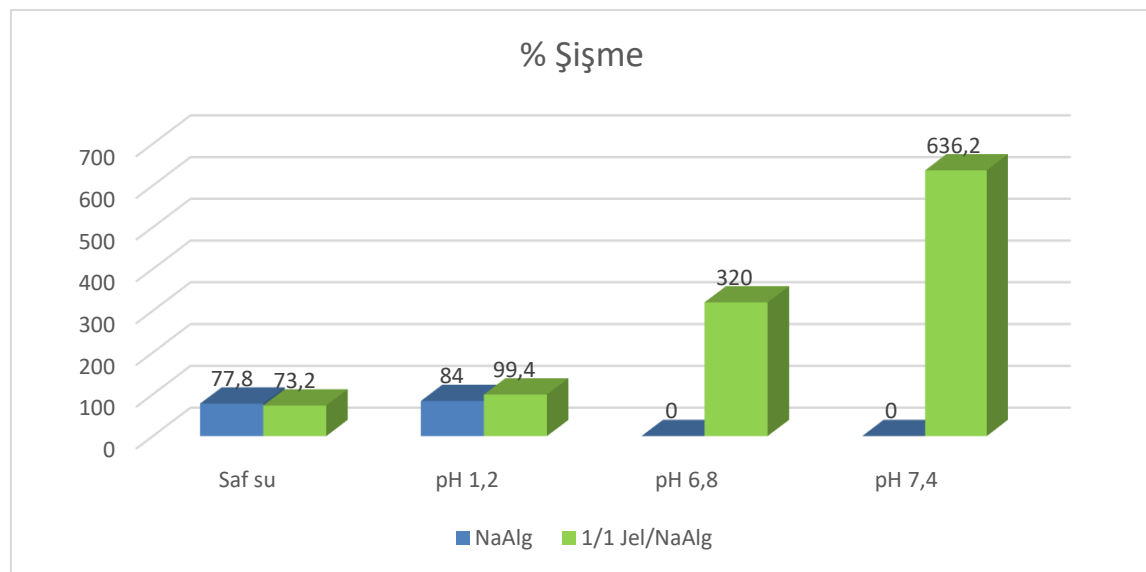
Çapraz bağlama süresinin şişme oranına etkisi incelendiğinde, süre arttıkça şişme değerlerinin azaldığı sonucuna varılmıştır. Çapraz bağ yoğunluğunun artmasıyla oluşan daha sıkı bir ağ yapısından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Roy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma da sonuçları destekler niteliktedir. Anyonik biyopolimer olan Jelatinin kürelerin şişme oranı üzerindeki etkisi incelendiğinde Jelatin miktarının arttırılmasıyla şişme

oranında artış gözlenmiştir. Jelatin miktarının artmasıyla ağın hidrofilik yapısının artmış olması ve bunun da daha büyük bir şişmeye sebep olmasından kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır (Roy ve diğerleri, 2009).

Çizelge 4.1. Boş mikrokürelerin denge şişme değerleri (%)

Formülasyon Kodu	Saf Su	pH 1,2	pH 6,8	pH 7,4
A4b	97,0	121,6	Mikroküreler parçalandı	Mikroküreler parçalandı
A5b	77,8	84,0	Mikroküreler parçalandı	Mikroküreler parçalandı
B3b	115,4	130,2	347,8	744
B4b	73,2	99,4	320,0	636,2
C1b	71,6	220,0	Mikroküreler parçalandı	Mikroküreler parçalandı
D2b	130,4	122,2	270	Mikroküreler parçalandı

(A: NaAlg, B:1/1 Jelatin/NaAlg, C: 1/2 Jelatin/NaAlg, D: 2/1 Jelatin/NaAlg, Çapraz bağlayıcı derişimi: 1M)



Şekil 4.6. Optimum koşulların sağlandığı mikrokürelerin denge şişme değerleri (%)

Ayrıca literatürde yer alan bir diğer çalışmada, Ca-Alg kürelerin asidik pH ortamından alınıp, pH 7,4 ortamına koyulduğunda Na^+ iyonları ile Ca^{2+} iyonları arasındaki etkileşim ile Ca^{2+} iyonlarının kürelerden hızla uzaklaşmasına bağlı olarak bozunduğu rapor edilmiştir (Bajpai,2004).

4.3. Farklı Formülasyonlarda Hazırlanan Mikrokürelerin Tutuklama Verimleri ve Mikroküre Verimleri

Çizelge 4.2’de çeşitli formülasyonlarda hazırlanan resveratrol yüklü mikrokürelerin tutuklama ve mikroküre elde etme verimleri yer almaktadır. Çizelge 4.2 incelendiğinde NaAlg kullanılarak hazırlanan mikroküreler için çapraz bağlama süresi 30 dakikadan 45 dakikaya çıkarıldığında % verimde ve tutuklama veriminde düşme görülmektedir. Jelatin/NaAlg kullanılarak hazırlanan mikrokürelerde ise NaAlg yüklü kürelerde görülen durumun tam tersine rastlanmıştır. Çapraz bağlama süresi 30 dakikadan 45 dakikaya çıkarıldığında % verimde ve tutuklama veriminde artış görülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu NaAlg kullanılarak hazırlanan mikroküreler için çapraz bağlayıcı derişiminin 0,5M’den 1M’a çıkarılmasıyla tutuklama ve mikroküre verimlerinin ciddi oranda arttığı gözlenmiştir. Ayrıca ortama Jelatin ilavesiyle tutuklama veriminde artış gözlenmiştir. Bu nedenle Jelatinin resveratrolün tutuklamasında etkisi olduğu söylenebilir. Etken madde/polimer oranı 1/4 oranından 1/2 oranına yükseltildiğinde hem NaAlg hem de Jelatin/NaAlg mikrokürelerin % verim ve tutuklama verimlerinde artış olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Cho ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, çapraz bağlayıcının oranının 1M’a çıkarılmasıyla tutuklama verimi nin %95.18’den % 97.29’ a çıktığı görülmüştür. Tutuklama veriminin yüksek çıkma sebebi resveratrolün suda az çözünme özelliğine bağlanmıştır (Cho ve diğerleri, 2014). İlaç kaybının olmaması, ilacın enkapsüle edilebilmesi nin tutuklama veriminde önemli olduğu düşünülmüştür.

Çizelge 4.2. Farklı formülasyonlarda hazırlanan mikrokürelerin tutuklama verimleri ve mikroküre verimleri

	Çapraz Bağlama Derişimi ve Süresi	Polimer Oranı (Jelatin/NaAlg)	Etken madde/ Polimer Oranı (w/w)	%TV	%Verim
A1	0,5 M -30dk	NaAlg	1/2	33,08	57,84
A2	0,5 M -30dk	NaAlg	1/4	19,50	93,13
A3	0,5 M -30dk	NaAlg	1/8	6,80	93,15
A4	1 M -30dk	NaAlg	1/2	67,93	99,72
A5	1 M -45dk	NaAlg	1/2	62,42	97,31
B1	1 M -30dk	1/1	1/4	22,08	81,51
B2	1 M-90 dk	1/1	1/4	22,92	89,82
B3	1 M -30dk	1/1	1/2	49,69	96,48
B4	1 M -45dk	1/1	1/2	63,19	96,59
C1	1 M -30dk	1/2	1/4	9,31	74,45
C2	1 M -45dk	1/2	1/2	51,51	94,64
C3	1 M -30dk	1/2	1/2	43,32	89,72
D1	1 M -30dk	2/1	1/4	23,88	78,96
D2	1 M -30dk	2/1	1/2	59,78	91,83
D3	1 M -45dk	2/1	1/2	61,34	98,70

(A: NaAlg, B:1/1 Jelatin/NaAlg, C: 1/2 Jelatin/NaAlg, D: 2/1 Jelatin/NaAlg)

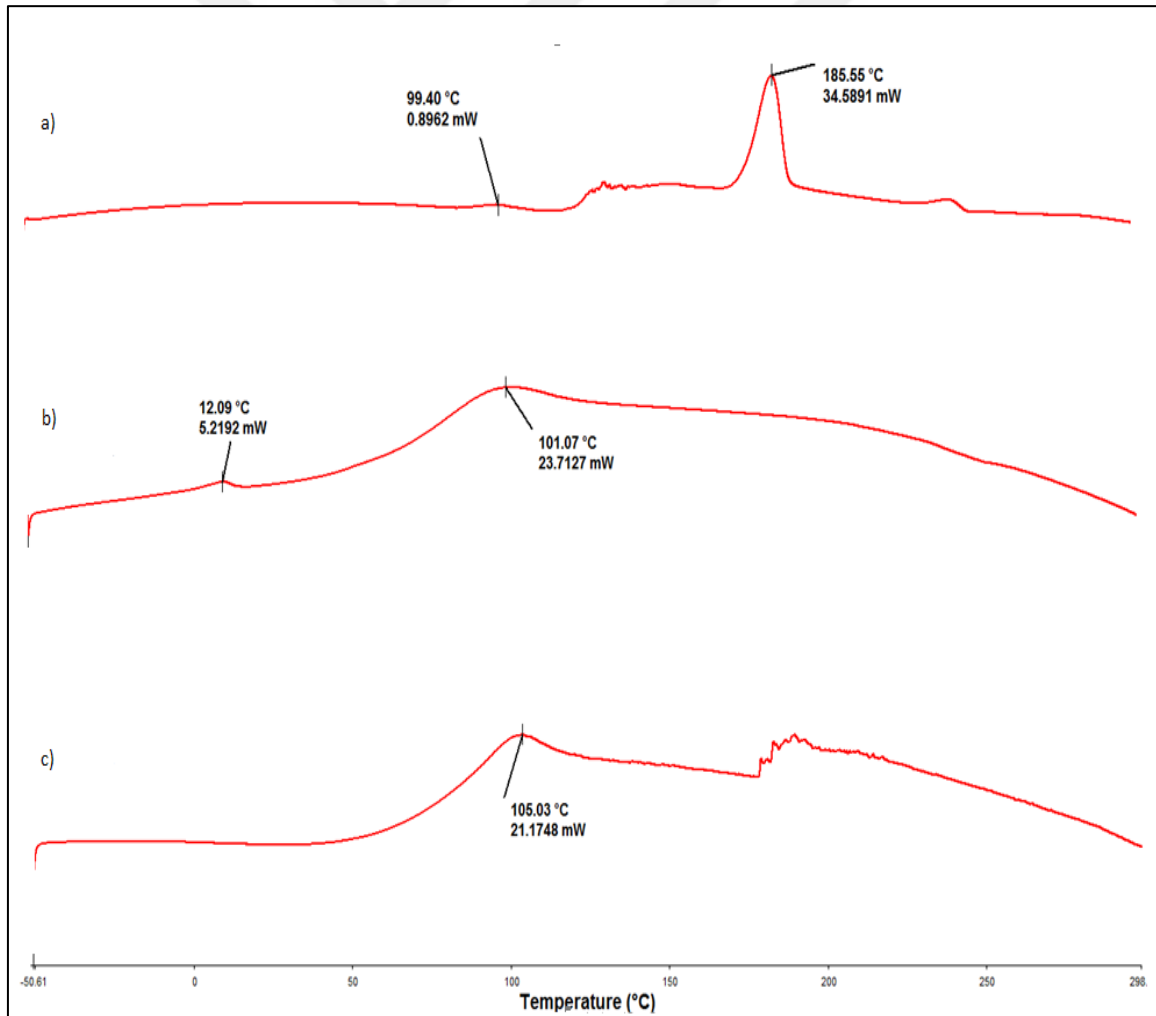
4.4. Mikrokürelerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramları

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi, boş mikroküre ve elde edilen en etkin resveratrol yüklü mikroküre örneklerinde, kullanılan polimerler ile resveratrol arasında oluşan etkileşimlerin belirlenebilmesi için gerçekleştirilmiştir.

Resveratrol, resveratrol yüklü 1/1 (w/w) formülasyonda Jelatin/NaAlg mikroküre ve boş küreye ait DSC termogramları Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Resveratrol, 185 °C’ de endotermik pik vermiştir. Ancak, resveratrol yüklü mikrokürede bu pik gözlenmemiştir. Bu durum ilacın mikroküre içerisine amorf dağılım gösterdiğini düşündürmüştür. Benzer şekilde Mendes ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada resveratrolün karakteristik erime pikinin resveratrol yüklü PHBV/PCL mikropartiküllerde görülmediği ve bu durumun ilacın küre içine amorf dağılım göstermesiyle açıklanabileceği ifade edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada da poli (epsilon-kaprolakton) (PCL), poli (D, L-laktik-ko-glikolik asit) -poli (etilen glikol), konjuge (PLGA-PEG-COOH) resveratrol yüklü nanopartiküller hazırlanmış ve resveratrolün partikül içine hapsedilmesiyle birlikte göstermiş olduğu karakteristik pik kaybolmuştur (Sanna, Siddiqui, Sechi ve Mukhtar, 2013).

Boş ve resveratrol yüklü Jelatin/NaAlg blend küreler incelendiğinde ise boş kürede 105 °C’de görülen endotermik pik, yapıya resveratrolün dâhil olması ile 4 °C düşmüştür. Gözlemlenen termal davranış değişikliklerinin küreler içinde polimerlerin spesifik fiziksel etkileşimler göstermesiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Sanna ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde resveratrol yüklü nanopartiküller hazırlanmış ve dolu kürede boş küreye kıyasla endotermik pikin 5 °C düştüğü görülmüştür (Sanna, Siddiqui, Sechi ve Mukhtar, 2013).

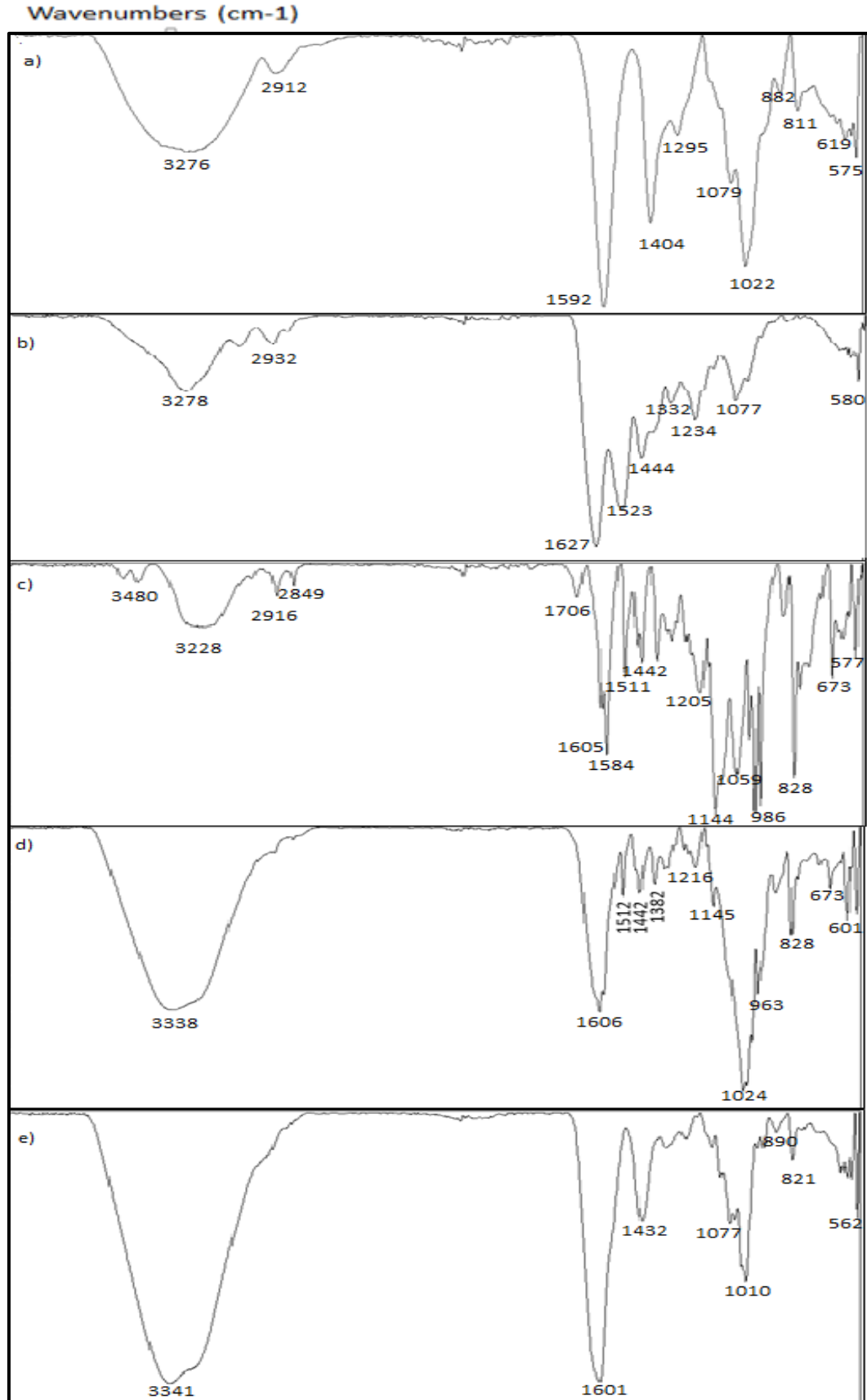


Şekil 4.7. Resveratrol, dolu ve boş mikrokürelerin DSC termogramları a) Resveratrol b) 1/1 formülasyonlu Jelatin/NaAlg mikroküreleri c) 1/1 Jelatin /NaAlg formülasyonlu boş mikrokürelerin DSC termogramları

4.5. Mikrokürelerinin FTIR spektrumları

FTIR spektrumu, molekülün kimyasal yapısı hakkında bilgi vermektedir. Her bir fonksiyonel grup ayrı karakteristik bant değerlerine sahiptir. 3700-2800 aralığında hidroksil grupları, 3450-2500 aralığı karboksil grupları, 3300-3500 amin grupları, 1820-1580 C=O çift bağı, 1000-1300 eter grupları ve 1580-1680 aralığı C=C çift bağı hakkında bilgi vermektedir. Resveratrol, resveratrol yüklü 1/1 (w/w) formülasyonda Jelatin/NaAlg mikroküreler, NaAlg ve Jelatinin FTIR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde hidroksil, NH, C=O, C=C ve eter fonksiyonel gruplarıyla ilişkili olarak belirgin bantlar gözlemlenmiştir. NaAlg'ın 3276 cm⁻¹'de verdiği gerilme bandının O-H ve COO (karboksil) gruplarına ait olduğu görülmüştür. Resveratrol ve Jelatinde COO grubunun olmaması benzer absorbanstaki NaAlg bandının daha geniş olmasını açıklamaktadır. Benzer şekilde 3278 cm⁻¹'de görülen gerilme bandının Jelatin yapısında bulunan NH gruplarına ait olduğu görülmüştür. Resveratrolün yapısında bulunan OH gruplarının ise spektrumda 3228 cm⁻¹'de gerilme bandına ait olduğu değerlendirilmiştir. Mikrokürelerin yapısındaki NH ve OH gruplarını çokluğu 3338 cm⁻¹'de daha geniş bir band görülmesine neden olmuştur. Sodyum aljinat ve Jelatin spektrumlarında sırasıyla 1592 cm⁻¹ ve 1523 -1627 cm⁻¹ de C=O grubuna ait gerilme bantları görülmüştür. Resveratrolde ise 1584-1605 cm⁻¹'de görülen bantların C=C grubuna ait olduğu görülmüştür. Mikroküre spektrumunda görülen 1606 cm⁻¹'deki bandın benzer absorbanstaki diğer spektrum piklerine göre daha geniş olması yapısındaki C=C ve C=O gruplarından kaynaklanmaktadır.

NaAlg FTIR spektrumunda görülen 1592 cm⁻¹'in mikrokürede 1606 cm⁻¹ e çıkmasının sebebinin kalsiyum ve sodyum iyonlarının yer değiştirme tepkimesine bağlı olduğu görülmüştür. Cho ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde mikrokürenin spektrumunda absorban değerinde artış görülmüştür (Cho ve diğerleri, 2014). Ayrıca Pongjanyakul ve arkadaşları tarafından yapılan resveratrol yüklü siklodekstrin nanosünger kullanılan bir diğer çalışmada, resveratrol ve NaAlg'da görülen hidroksil bantlarının absorban değerleri mikrokürede artmış olarak değerlendirilmiştir. Benzer durum çalışmamızda da gözlenmiştir (Pongjanyakul ve Rongthong, 2010). Resveratrolün spektrumunda 1584 -1605 cm⁻¹'de görülen C=C bandının mikrokürede de 1606 cm⁻¹'de görülmesi resveratrolün mikroküre içine bozunmadan enkapsüle olduğunu düşündürmüştür. Boş mikroküreler ile resveratrol yüklü mikrokürelerin spektrumları karşılaştırıldığında bantların benzer absorban değerlerinde olduğu görülmüştür.



Şekil 4.8. Resveratrol, NaAlg, jelatin ve mikrokürelere FTIR spektrumları a) NaAlg, b) Jelatin c) Resveratrol d) 1/1 formülasyonlu Jelatin/NaAlg mikroküreleri e) 1/1 Jelatin/NaAlg formülasyonlu boş mikrokürelere

Saf Jelatin ve NaAlg, boş Jelatin/NaAlg kürelerine ait FTIR spektrumları karşılaştırıldığında NaAlg'ın 3276 cm⁻¹'de verdiği gerilme bandının O-H (hidroksil) gruplarının pik değerleri olduğu görülmektedir. 1592 ve 1404 cm⁻¹'de görülen pikler ise NaAlg'ın karakteristik karboksil gruplarını temsil etmektedir. Saf Jelatinin ana karakteristik pikleri ise 3278 cm⁻¹'de görülen gerilme bandının Jelatin yapısında bulunan NH gruplarına ait olduğu değerlendirilmiştir. 2932 cm⁻¹'de görülen pikin C-H gerilme bandını, 1444 cm⁻¹ 'de görülen pikin alifatik C-H düzlem içi eğilme bandını, 1077 cm⁻¹ 'deki geniş pik C-C, C-O, C-N gerilme bantlarını göstermektedir (Erdik, 2007). Sodyum aljinattaki hidroksil grupları ile Jelatindeki NH grupları ile etkileşime geçerek 3341 cm⁻¹'de geniş bir bant gözlenmesine ve NaAlg ve Jelatinde yer alan sırasıyla 2912 ve 2932 cm⁻¹ piklerin kaybolmasına neden olduğu değerlendirilmiştir.

Resveratrol ve 1/1 formülasyonlu resveratrol yüklü Jelatin/NaAlg mikroküreleri değerlendirildiğinde, resveratrolün spektrumunda 3228 cm⁻¹'de görülen bant ile resveratrolün hidroksil gruplarının absorpsiyon değeri görülmektedir. Resveratrolün yapısında bulunan aromatik halkaların ise 1605 ve 1584 cm⁻¹ 'de pik verdiği görülmektedir. Mikroküre içerisine resveratrolün enkapsüle edilmesiyle hidroksil gruplarına ait 3338 cm⁻¹'de görülen bandın genişlediği gözlenmiştir. Ayrıca resveratrole ait gerilme bantlarının, resveratrolün enkapsülasyonu ile birlikte baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.10).

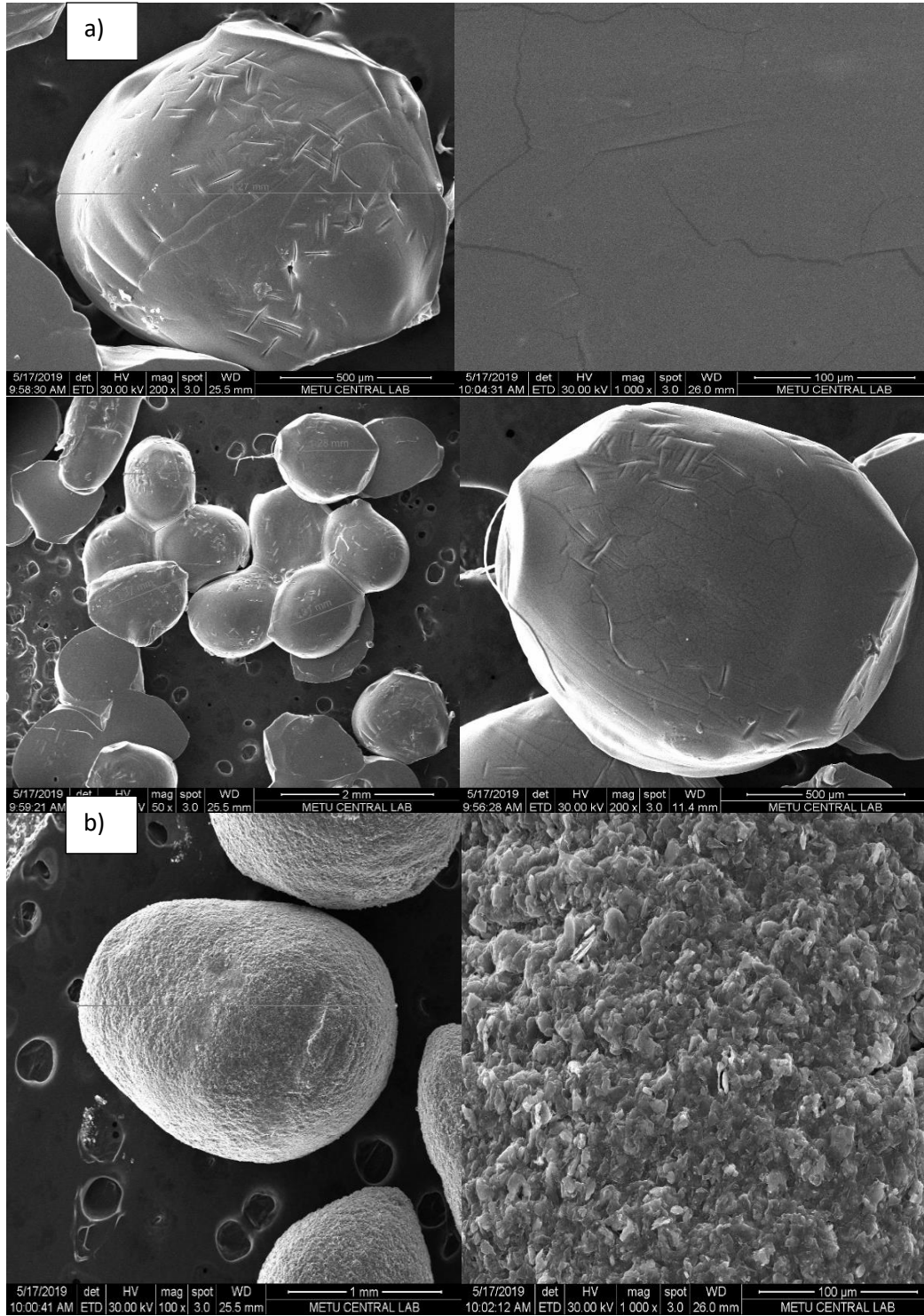
4.6. Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikrograf (SEM) Görüntüleri

Resveratrol yüklü mikroküreler ve boş mikroküreler taramalı elektron mikrografı ile analiz edilmiştir. Numuneler hazırlanıp yüzeyleri taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirilmiştir. P/P oranı 1/1 formülasyonundaki resveratrol yüklü ve boş mikrokürelerin 50x, 100x, 200x ve 1000 büyütme SEM fotoğrafları Resim 4.1'de verilmiştir.

Resim 4.1'de yer alan SEM görüntüleri, analizi sonucu elde ettiğimiz resveratrol yüklü mikrokürelerin iyonotropik jelasyon yöntemi ile kaplamanın mümkün olduğunu doğrulamaktadır. Resveratrol yüklü mikroküreler küresel bir form ve düzensiz bir şekil yüzey yapısı sunmuştur.

SEM analizleri sonucu elde ettiğimiz görüntülerde, boş Jelatin/Sodyum aljinat blend kürelerin dolu kürelere göre daha homojen ve düzenli bir şekle sahip olduğu, pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Literatürde de benzer şekilde pindolo yüklü aljinat/Jelatin kürelerin küresel ve pürüzsüz yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Mikrokürelerin çapı 900 ila 1400 μm arasında değişen, heterojen dağılım göstermiştir. İlacın polimer içinde dağılması ve etkileşime girmesi partikül boyutunda artışa neden olmaktadır (Almeida, 2004). Kürelerin kurutulması sürecinde başlangıçta oldukça küresel yapıda olan kürelerin şekillerinde bozulma görülebilmektedir. Resveratrol yüklü mikrokürelerin yüzey morfolojisi incelendiğinde ilacın küre içinde homojen dağılıp hapsedildiği görülmüştür. Bu durum FTIR analiz sonucu ile de desteklenmiştir.

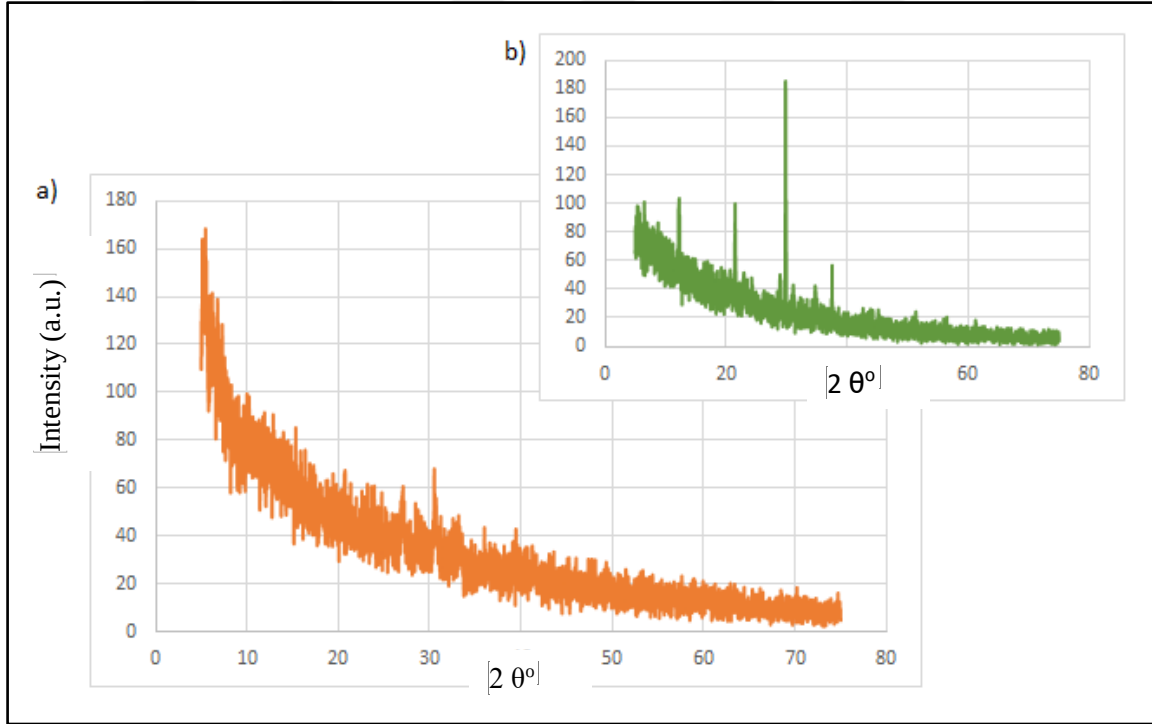




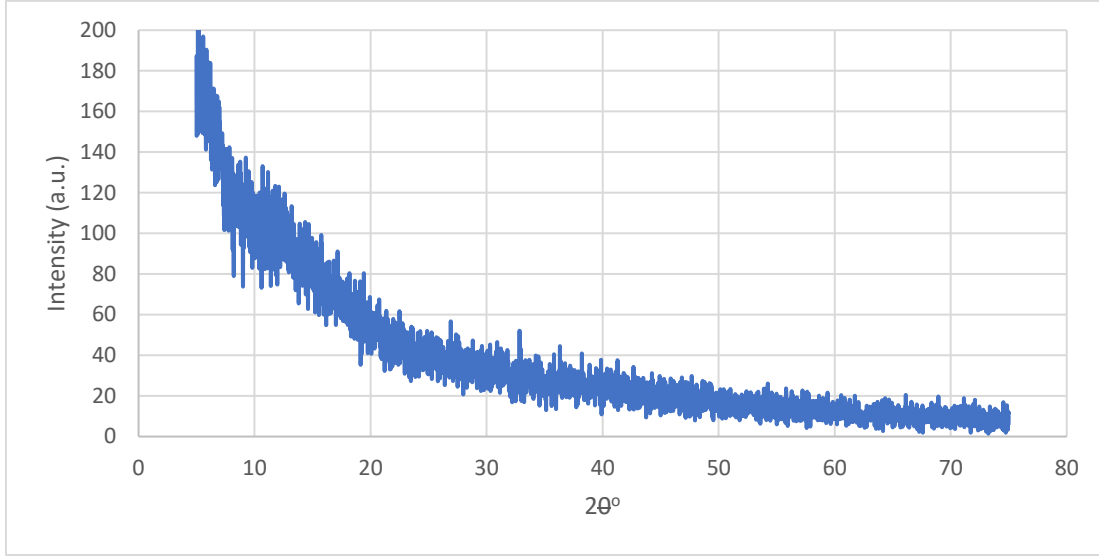
Resim 4.1. Mikrokürelerin SEM görüntüleri a) Boş Jelatin/NaAlgküre, b) Resveratrol yüklü Jelatin/NaAlg blend küre

4.7. Mikrokürelerin X-Işını Kırınımı Eğrileri

Hazırlanan boş ve resveratrol yüklü X-ışını kırınımı ölçülmüştür. Mikrokürelerin Şekil 4.9'da resveratrol yüklü mikroküre ve resveratrole, Şekil 4.10'da boş mikroküreye ait XRD spektrumları verilmiştir. Resveratrolün XRD spektrumu incelendiğinde, kristal yapısından kaynaklı 6.5° , 12.3° , 21.5° , 29.8° ve 37.5° 'te karakteristik pikler verdiği görülmüştür. Literatürde de saf resveratrol aynı aralıklarda karakteristik pikler vermiştir (Saralkar ve Dash, 2017). Ancak, resveratrol yüklü mikroküreler incelendiğinde yalnızca $30,5^\circ$ şiddetinde karakteristik pike rastlanmıştır. Resveratrolün kristal durumundaki değişikliklerin, iyonotropik jelasyon yöntemiyle kürelerin oluşumunda meydana geldiği düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Dolu mikrokürelerin ve Resveratrolün XRD spektrumları a) 1/1 formülasyonlu Jelatin/NaAlg mikroküreleri b)Resveratrol



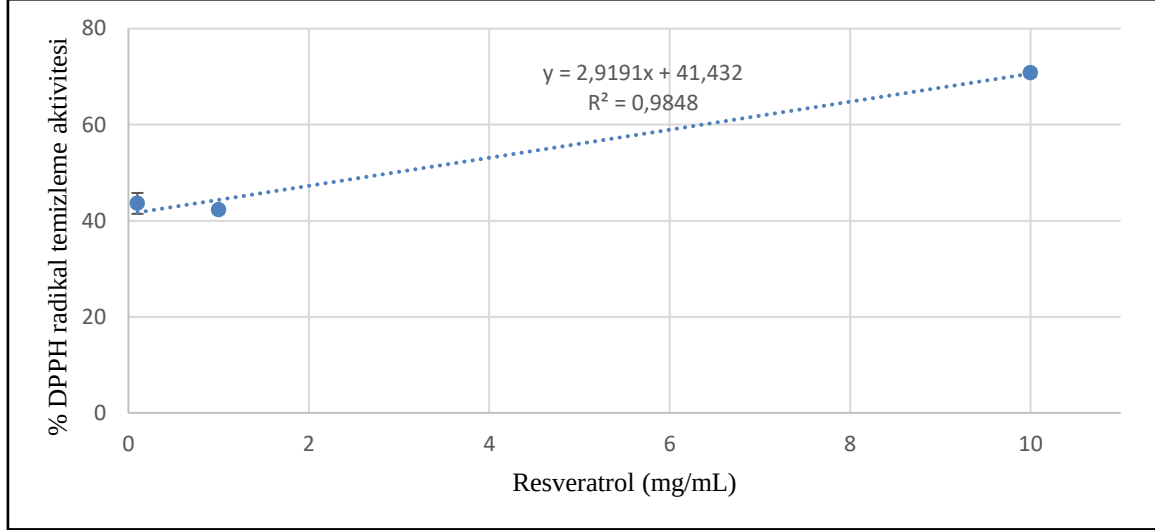
Şekil 4.10. Boş mikrokürelerin XRD spektrumları

Ayrıca, resveratrol yüklü mikroküreler ile boş mikroküreler karşılaştırıldığında dolu kürenin XRD spektrumunda $30,5^{\circ}$ şiddetinde görülen pikin boş mikrokürenin spektrumunda $32,8^{\circ}$ şiddetinde olduğu görülmüştür. Dolu küre spektrum şiddetinde boş küreye kıyasla azalma olmasının sebebinin resveratrol ve polimer zincirleri arasındaki etkileşim ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Literatürde yer alan NaAlg ve Jelatin karakteristik pikleri ele alındığında boş ve dolu Jelatin/NaAlg blend kürelerinde bu piklerin kaybolduğu görülmüştür. Bu durumun Jelatinin amin grubu ve NaAlg'ın karboksil grubu arasındaki elektrostatik etkileşime bağlı olarak kaybolduğu görülmüştür (Tu ve diğerleri, 2015).

4.8. Mikrokürelerin Antioksidan Aktiviteleri

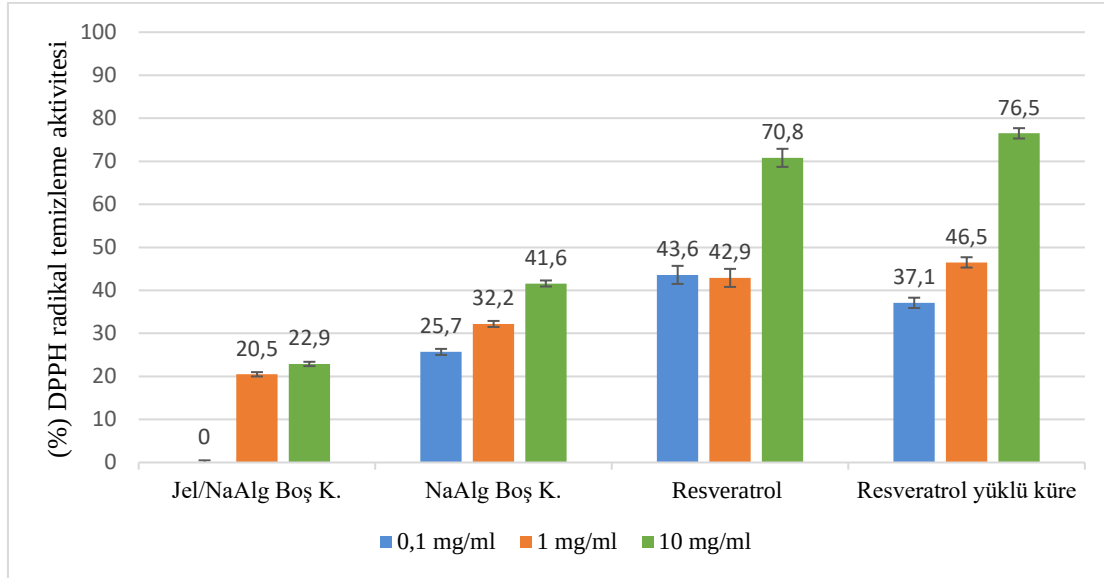
Çalışma kapsamında, mikro kapsüllemenin resveratrolün antioksidan kapasitesi üzerinde etkili olup olmadığını araştırmak için aynı etken madde konsantrasyonlarında resveratrol ve resveratrol yüklü mikrokürelerin antioksidan aktivitesi DPPH radikal süpürme kapasitesine göre belirlenmiştir (Bkz.Şekil 4.12). En yüksek DPPH radikal süpürme yüzdesi resveratrol yüklü mikrokürelerde görülmüştür. Resveratrolün konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivitesi de artış göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Resveratrolün 517 nm'de verdiği absorbans sonuçlarından mg/mL cinsinden IC_{50} değerinin hesaplandığı grafik Şekil 4.11'de verilmiştir. DPPH yüzde temizleme aktivitesi için IC_{50} değeri, resveratrol konsantrasyon eğrisine karşı yüzde inhibisyonu yapıldıktan sonra elde edilen denkleme göre

hesaplanmıştır. Resveratrol'ün DPPH yüzde radikal süpürme aktivitesi için IC₅₀ değerinin 2,9 mg/mL olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan resveratrolün, DPPH radikal temizleme aktivitesi yüzdelere göre 517 nm’de verdiği grafik

10 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan resveratrol, resveratrol yüklü mikroküre ve boş kürelerin antioksidan aktiviteleri sırasıyla %70,8, %76,5 ve %22,97 şeklinde görülmüştür. En düşük antioksidan aktiviteyi ortamda resveratrolün olmadığı boş mikroküreler göstermiştir. Resveratrolün mikroküre içine hapsedilmesiyle birlikte radikal süpürme aktivitesinde yaklaşık %6 artış gözlenmiştir. Antioksidan aktivitedeki artışın, daha düşük antioksidan aktiviteye sahip NaAlg ve Jelatin ile oluşan sinerjistik etki nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, Jelatin/NaAlg blend mikroküreleri, resveratrolün *in vivo* biyoyararlanımının uzatılması amacıyla kontrollü salım çalışmalarında taşıyıcı olma özelliğiyle potansiyel bir araç olarak öne çıkmaktadır. Farmasötik amaçlar için saf bileşikten daha umut verici bir antioksidan etkiye sahiptir.



Şekil 4.12. Resveratrolün DPPH radikal temizleme (antioksidan) aktivitesi

Resveratrol yüklü mikroküreler, resveratrolün antioksidan etkisini koruduğu ve arttırdığı için mikrotasıyıcı sistemlerin, etken maddenin bozunmadan korunmasında uygun bir sistem sunduğunu söylemek mümkündür.

Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmıştır. Soldati ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada resveratrol yüklü solid lipid nanopartikül, boş nanopartikül ve saf resveratrolün antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Resveratrol yüklü nanopartiküller (R-SLN), resveratrol ve boş kürelere kıyasla daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bir antioksidan aktivite göstermiştir. R-SLN’de görülen antioksidan aktivite saf resveratrole oranla % 20 daha yüksek çıkmıştır. Düşük antioksidan aktivite gösteren boş kürelere resveratrol ile birlikte sinerjistik antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (Soldati ve diğerleri, 2018).

Ayrıca, Jeong ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada resveratrol yüklü mikrokürelerde saf resveratrole göre daha düşük süpürme aktivitesi görülmüş olup bunun kürenin kontrollü salımına bağlı olduğu düşünülmüştür. İlaç salımı arttıkça antioksidan aktivitesinde aynı oranda artacağı sonucuna varılmıştır (Jeong ve diğerleri, 2016).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal antioksidanların insan sağlığını potansiyel olarak iyileştirebilecek faydalı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Polimerik mikro/nanotaşıyıcılar yoluyla antioksidanların hedeflenen bölgeye gönderilmesi, biyoaktif bileşenin bozulmadan korunması, biyoyararlanımında artış, bileşenin etki bölgesinde kontrollü bir şekilde salınması gibi avantajlar sunmaktadır. Bileşiklerin enkapsüle edilebilmesi için çeşitli yöntemler mevcuttur. Her yöntemin avantajları ve dezavantajları vardır. En uygun yöntemin seçimi, aktif bileşenin ve polimerin kimyasal özelliklerine bağlıdır. Mikro/nanopartikül formülasyonu için polimer konsantrasyonu, polimer moleküler ağırlığı, ve kullanılan çözücüler mevcut tüm yöntemlerde önemli rol oynamaktadır. Aktif bileşenin kimyasal yapısı, enkapsüle edilen ilaç miktarı, polimerin hidrofobik-hidrofilik davranışı, sıcaklığı, pH'ı, polimer yapısı gibi parametreler salım profilini etkilemektedir (Garti, 2008).

Tüm bu parametrelerden yola çıkarak tez çalışması kapsamında resveratrol yüklü blend küreler Jelatin ve NaAlg biyopolimerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Blend küre ile tek başına Jelatin veya tek başına aljinat yapısından daha güçlü ve stabil yapıda küre elde etmek amaçlanmış ve karşılaştırma yapabilmek adına Jelatin/NaAlg küreleri dışında resveratrol yüklü NaAlg mikroküresi sentezlenmiş ve salım profilleri çıkarılmıştır.

pH, polimer oranı ve enkapsüle edilen etken madde miktarı gibi parametreler ayrı ayrı değerlendirilerek salıma etkisi incelenmiş tutuklama verimleri, denge şişme değerleri ve ilacın salım yüzde verimlilikleri belirlenmiştir.

FTIR, XRD ve DSC karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına göre Jelatinin amin grubu ile NaAlg'ın karboksil grubu arasında elektrostatik etkileşim görülmüştür. Ayrıca, resveratrol yüklü mikrokürelerin yüzey morfolojisi incelendiğinde küresel formda olduğu ve resveratrolün küre içinde homojen dağılıp hapsedildiği görülmüştür. Bu durum FTIR analiz sonucu ile de desteklenmiştir.

NaAlg ile elde edilen mikrokürelerin gözenek alanının büyük olmasından kaynaklı enkapsüle edilen resveratrol Jelatin/NaAlg kürelere kıyasla daha hızlı salınmış ve pH 7,4'te bozunmuştur.

Salım çalışmaları 37 °C çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir, oral uygulamayla alınan resveratrol, ağızdan alındıktan sonra mide-bağırsak yolağından emilimi sağlandığı için mide-bağırsak salım ortamlarının pH'sı belirlenmiştir.

Etken madde/ polimer oranı 1/2 olan Resveratrol yüklü NaAlg mikrokürelerinde salım miktarı % 38,5 olarak ve tutuklama verimi % 62,42 bulunmuştur.

Blend Jelatin/NaAlg kürelerde salımın daha kontrollü olduğu gözlenmiştir. En iyi etken madde salımı Jelatin/NaAlg 1/1 olan mikrokürelerde tespit edilmiştir. Blend mikroküreler ile elde edilen en iyi tutuklama verimi %63,19, salım miktarı ise % 75,3 olarak bulunmuştur.

NaAlg ve blend mikrokürelerde çapraz bağlama süresi ve çapraz bağlama çözeltisinin derişiminin artması ile resveratrol salımının da paralel olarak arttığı sonucuna varılmıştır. En etkin kürenin, CaCl₂ çapraz bağlayıcı derişiminin 1 M ve çapraz bağlama süresinin 45 dakika olduğu koşullarda sağlandığı görülmüştür.

1/1 Jelatin/NaAlg mikrokürelerin resveratrolün salımı sırasında salım ortamının pH'sından etkilendiğı ve midenin asidik ortamından bağırsak pH'ına geçtikçe salımın hızlandığı görülmüştür. En yüksek salımın ise pH 7,4'de gerçekleştiğı sonucuna varılmıştır.

DPPH yöntemi ile resveratrolün antioksidan kapasitesi incelendiğinde en yüksek değer % 76,5 ile resveratrol yüklü kürelerde görülmüştür. Resveratrolün antioksidan kapasitesi %70,8 iken biyouyumlu polimerlerle oluşturulan resveratrol yüklü kürelerde bu oranın yapıya dâhil olan polimerlerle ilişkili olarak %76,5'e ulaştığı görülmüştür.

Sonuç olarak, resveratrolün antioksidan özellik gösterdiği ve yaygın olarak kullanılmaya başlayan takviye edici gıdalar arasında olduğu bilinmektedir. Resveratrolün mikroküre içine hapsedilmesiyle antioksidan aktivitesindeki artış çalışmanın amacını destekler niteliktedir. Ayrıca literatür araştırmalarında daha önce yapılmış resveratrol yüklü Jelatin-NaAlg blend polimerlerin üretildiğı bilgisine rastlanmamıştır. Çalışmanın neticesinde, iyonotropik jelasyon yöntemi ile Jelatin-NaAlg karışımlarından mikroküreler elde edilebildiğı ve elde edilen kürelerin kontrollü ilaç salım mekanizmalarında faydalanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Polifenolik bileşiklerin mikroenkapsülasyon teknolojisi ile geliştirilmesi, terapötik özelliklerinin ön plana çıkması ile birlikte dünyada önemli hale gelen tıbbi

bitkilerin pek çok alanda özellikle de ilaç endüstrisinde kullanımı trendine uyum sağlayacağı ve ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Resveratrol'un pahalı bir hammadde olması nedeniyle ülkemiz kaynaklarından üretilmesinin ve ticarileştirilmesinin ekonomiye önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, resveratrolün hangi kaynaktan elde edildiği de önemli bir etkidir.

Resveratrol kaynağının yetişmesinin uygun olduğu bölgeler belirlenerek yetiştirilmesinin teşvik edilmesi, bu kapsamda Ar-Ge ve üretim çalışmalarının geliştirilmesinin ülkemize sağlayacağı katkılar açısından değerli olduğu görülmektedir. Ancak resveratrol'un kullanımına ilişkin daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Sağlık üzerine olumlu etkileri göz önüne alındığında, halk sağlığı açısından önem arz eden akılcı kullanıma ilişkin bilinçlendirme çalışmalarının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Resveratrol yüklü mikrokürelerin hücre kültüründe toksisite çalışmalarının yapılması, antikanser etkisinin de detaylı araştırılması, kanser tedavisinde yardımcı/tamamlayıcı tedavi amaçlı kullanımına yönelik Ar-Ge çalışmalarının yapılması, ilaç olarak kullanılıp kullanılmayacağına karar verildikten sonra faz çalışmalarına başlanması önerilmektedir.

Literatür taraması neticesinde resveratrolün biyoyararlanımının düşük olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar kapsamında resveratrolün salım süresinin mikro/nano taşıyıcı sistemler aracılığıyla uzayabildiği tespit edilmiştir. Benzer yöntemlerle biyoyararlanımının da arttırılabileceği düşünülmüş olup buna yönelik olarak *in vivo/in vitro* çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Gupta, S., and Sekhon, L. (2008). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(3), 1375–1403.
- Aggarwal, B., and Shishodia, S. (Eds.) (2006). *Resveratrol in Health and Disease*, New York: CRC Press Taylor and Francis Group, 1-15, 42-56 .
- Aggarwal, B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R., Seeram, N., Shishodia, S., and Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24(5), 2783-2810.
- Alamo, A., Condorelli, R., Mongioi, L., Giacone, F., Calabrese , V., Vignera, S., and Calogero, A. (2019). Environment and Male Fertility: Effects of Benzo-alpha-Pyrene and Resveratrol on Human Sperm Function in Vitro. *Journal of Clinical Medicine*, 8(4), 561-570.
- Almeida, P. A. (2004). Cross linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolo. *Journal of Controlled Release*, 97(3), 431-439.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektasoglu, B., and Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Azevedo, H. S., Reis, R. L. (2005). Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate. In Reis R.L.(Ed.), *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. USA: CRS Press, 177-201.
- Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. S., Ramkanth, S., Rajan, T., and Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research* , 2(2), 1276-1285.
- Bajpai, A. B. (2004). In vitro release dynamics of insulin from a loaded hydrophilic polymeric network. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 15(1), 43-54. doi:10.1023/B:JMSM.0000010096.48608.5b
- Bastioli, C. (2005). *Handbook of Biodegradable Polymers* . United Kingdom: Rapra Technology Limited, 183-190.
- Basu, S., and Adhiyaman, R. (2008). Preparation and Characterization of Nitrendipine loaded Eudragit RL 100 Microspheres Prepared by an Emulsion-Solvent Evaporation Method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1033-1041.
- Baur, J., and Sinclair, D. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506.
- Benita, S. (1996). *Microencapsulation: Methods and Industrial applications*, New York: Marcel Dekker, 30-57, 86-114, 280-345.

- Benzie, I., and Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., and Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Npj Precision Oncology*, 25(1), 35-43.
- Bhatia, S. (2016). *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. India: Springer, 1-20, 85-116.
- Bhoyar, N., Giri, T.K., Tripathi, D.K., Alexander, A., and Ajazuddin, A. (2012). Recent advances in novel drug delivery system through gels: review. *Journal of Pharmacy and Allied Health Sciences*, 2(2), 21–39.
- Bo, S., Ciccone, G., Castiglione, A., Gambino, R., De Michieli, F., Villos, P., Durazzo, M., Cavallo-Perin, P., and Cassader, M. (2013). Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Current Medicinal Chemistry*, 20(10), 1323-1331.
- Boskou, G. (2010). Antioxidant Capacity and Phenolic Profile of Table Olives from the Greek Market. In V. W. Preedy (Ed.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Athens, Greece: Academic Press, 925-934.
- Brown, L., Kroon, P., Das, D., Das, S., Tosaki, A., and Chan, V. (2009). The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1513-1523.
- Bu, L., Gan, L.C., Guo, X.Q., Chen, F.Z., Song, Q., Qi-Zhao, Gou, X.J., Hou, S.X., and Yao, Q. G. (2013). Trans-resveratrol loaded chitosan nanoparticles modified with biotin and avidin to target hepatic carcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*, 452 (1), 355-362.
- Cal, C., Garban, H., Jazirehi, A., Yeh, C., Mizutani, Y., and Bonavida, B. (2003). Resveratrol and Cancer: Chemoprevention, Apoptosis, and Chemoimmunomodulation. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 3(2), 77-93.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., and Alonso, M.J. (1997). Novel hydrophilic chitosan –polyethylene oxide nanoparticles as protein carrier. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.
- Carpéné, C. L., Les, F., Cásedas, G., Peiro, C., Fontaine, J., Chaplin, A., Mercader, J., and López, V. (2019). Resveratrol Anti-Obesity Effects: Rapid Inhibition of Adipocyte Glucose Utilization. *Antioxidants*, 8(3),74.
- Carter, M., and Shieh, J. (2015). Microscopy. In M. Carter and J. Shieh (Eds.), *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Stanford, USA: Academic Press, 117-144.
- Chen, L., Remondetto, G. and Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17(5), 272-283.
- Cho, A. C., Chun, Y. G., Kim, B. K., and Park, D.J. (2014). Preparation of alginate–CaCl₂ microspheres as resveratrol carriers. *Journal of Material Science*, 49(13), 4612-4619.

- Cho, A. C., Chun, Y. G., Kim, B. K., and Park, D. J. (2014). Preparation of Chitosan-TPP Microspheres as Resveratrol Carriers. *Journal of Food Science*, 79(4), 568-576.
- Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J. W., Arunachalam, G., and Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 79-90.
- Das, M., and Das, D. (2010). Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 503-512.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2012). Dietary (poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects against Chronic Diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Dercks, W., and Creasy, L. (1989). Influence of foseyl-A1 on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(3), 203-213.
- Docherty, J., Fu, M., Hah, J., Sweet, T., Faith, S., and Booth, T. (2005). Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse. *Antiviral Research*, 67(3), 155-162.
- Duthie, G., Duthie, S., and Kyle, J. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Review*, 13(1), 79-106.
- Erdik, E. (2007). *Organik kimyada spektroskopik yöntemler*. Ankara: Gazi Kitabevi, 531.
- Fan, L. S. (1989). Controlled Release: a Quantitative Treatment. In P. N. (Ed.), *Polymer properties and Applications*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 13, 250.
- Frémont, L., Belguendouz, L., and Delpal, S. (1999). Antioxidant activity of resveratrol and alcoholfree wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*, 64(26), 2511-2521.
- Frankel, E., and Finley, J. (2008). How to standardized the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4901-4908.
- Gaikwad, A., Pathade, P., Bidkar, S., and Pawar, A. (2011). Formulation and Evaluation of Multi Particulate Drug Delivery System of Glipizide by Using Crossed Linked Chitosan. *Journal of Pharmacy Research*, 4(1), 300-303.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., and Borras, C. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 13 pages. doi:10.1155/2015/837042.
- Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A., and Sobel, R. (Eds.). (2014). *Microencapsulation in the Food Industry A Practical Implementation Guide*, USA: Elsevier, 3-25.

- Garti, N. (Ed.). (2008). *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 3-27, 48-64, 150-179.
- Ghosh, S. (Ed.). (2006). *Functional Coatings by Polymer Microencapsulation*, Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co, 11-26.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., and Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.
- Giri, T. (2016). Alginate Containing Nanoarchitectonics for Improved Cancer Therapy. In A. M. Holban and A. Grumezescu (Eds.), *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*. Cambridge: Elsevier, 565-588.
- Giri, T. K., Kumar, K., Alexander, A., Ajaz, A., Badwaik, H., Tripathy, M., and Tripathy, D.K. (2013). Novel controlled release solid dispersion for the delivery of diclofenac sodium. *Current Drug Delivery*, 10(4), 435–443.
- Groenewoud, W. (2001). Differential Scanning Calorimetry. In W. Groenewoud (Ed.), *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*. The Netherlands: Elsevier Science, 10-60.
- Gupta, S., Caraballo, M., and Agarwal, A. (2019). Total Antioxidant Capacity Measurement by Colorimetric Assay. In R. Henkel, L. Samanta, and A. Agarwal (Eds.), *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*. USA: Academic Press, 207-215.
- Gutcho, M. (1976). *Microcapsules and Microencapsulation Techniques*. New Jersey, USA: Noyes Data Co, 35- 62, 87-112, 175-196, 247-280.
- Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(10), 968-974.
- Haque, S. M. (2014). Development and evaluation of braintargeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. *Journal of Psychiatric Research*, 48(1), 1-12.
- Harbone, J., and Williams, C. (2000). Advances in Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Haug, I. D. (2011). Gelatin. In G. W. Phillips (Ed.), *Handbook of Food Proteins* Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing, 92-115.
- Hemalatha, K., Lathaeswari, R., Suganeswari, M., Senthil Kumar, V., and Anto, S. (2011). Formulation And Evaluation Of Metoclopramide Hydrochloride Microbeads By Ionotropic Gelation Method. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 2(3), 921-925.
- Hillis, W., Hart, J., and Yazaki, Y. (1974). Polyphenols of Eucalyptus sideroxylon wood. *Phytochemistry*, 13(8), 1591-1595.
- Holtz, R. (2009). *Skin Aging Handbook*. USA: Elsevier BV, 329-362.

- Huang, Y., Zhu, X., Chen, K., Lang, H., Zhang, Y., Hou, P., Ran L., Zhou, M., Zheng, J., Yi, L., Mi, M. and Zhang, Q. (2019). Resveratrol prevents sarcopenic obesity by reversing mitochondrial dysfunction and oxidative stress via the PKA/LKB1/AMPK pathway. *Aging*, 11(8), 2217-2240.
- Jang, J., and Surh, Y. (2001). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma. *Mutation Research*, 496(1-2), 181-190.
- Jeong, H., Samdani, K., Yoo, D., Lee, D., Kim, N., Yoo, I., and Lee, J. (2016). Resveratrol cross-linked chitosan loaded with phospholipid for controlled release and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, (93), 757-766.
- Jeyakumari, A., Zynudheen, A.A., and Parvathy, U. (2016). Microencapsulation of bioactive food ingredients and controlled release-a review. *MOJ Food Processing and Technology*, 2(6), 214-224.
- Karthikeyana, S., Rajendra Prasada, N., and Ganaman, A. (2013). Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 3(1), 64-73.
- Kharkwal, H., and Janaswamy, S. (2017). *Natural Polymers for Drug Delivery*. UK: CAB International, 20-86.
- Kim, S., Jin, Y., Choi, Y., and Park, T. (2011). Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochemical pharmacology*, 81(11), 1343-1351.
- Kim, J. H., Park, E.Y., Ha, H.K., Jo, C.M., Lee, W.J., Lee, S.S., and Kim, J.W. (2016). Resveratrol-loaded Nanoparticles Induce Antioxidant Activity against Oxidative Stress. *Asian Australasian Journal of. Animal Sciences*, 29(2), 288-298.
- King, A., and Young, G. (1999). Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218.
- King, R., Bomser, J., and Min, D. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 5(3), 65-70.
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), 145-158.
- Koga, C. C. (2016). Stability of Trans-Resveratrol Encapsulated in a Protein Matrix Produced Using Spray Drying to UV Light Stress and Simulated Gastro-Intestinal Digestion. *Journal of Food Science*, 81(2), 292-300.
- Kommareddy, S., Shenoy, D., and M, M. (2005). Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. *Nanotechnologies for the Life Sciences*, 1(1), 330-352.
- Kreuter, J. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 65-81.

- Kumar, S. (2014). The Importance Of Antioxidant And Their Role In Pharmaceutical Science - A Review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 27-44.
- Kundu, J. K. (2006). Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis*, 27(7), 1465–1474 .
- Le, V. T., Lovalenti, P. And Abdul-Fattah, A. M. (2015). Stabilization Challenges and Formulation Strategies Associated with Oral Biologic Drug Delivery Systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 93, 95-108
- Lee, Y. K., Mijan, M. A., Ganesan, P., Yoo, S., and Kwak, H.S. (2013). The physicochemical properties of yoghurt supplemented with microencapsulated peanut sprout extract, a possible functional ingredient. *International Journal of Dairy Technology*, 66(3), 417-423.
- Lima, G., Vianello, F., Corrêa, C., Campos , R., and Borguini, M. (2014). Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1065-1082.
- Litescu , S., Eremia , S., and Radu, G. (2010). Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. In Giardi M.T., Rea G. and Berra B. (Eds.), *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer, 241-249.
- Losa, G. (2003). Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 33(9), 818-823.
- Lu, R., and Serrero, G. (1999). Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 179(3), 297-304.
- Mandal, S., Kumar, S.S., Krishnamoorthy, B., and Basu, S.K. (2010). Development and evolution of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(4), 785-793.
- Mendes, J., Riekes, M., Oliveira, V., Michel , M., Stulzer, H., Khalil, N., and Farago, P. (2012). PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. *The Scientific World Journal*, 13 pages. doi: 10.1100/2012/542937.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., and Gopinathan , V. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.
- Mohan, A., Narayanan, S., Sethuraman, S., and Krishnan, U. M. (2013). Combinations of plantpolyphenols and anti-cancer molecules: a novel treatment strategy for cancer chemotherapy. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(2), 281-295.

- Munin, A., and Levy, F. (2011). Encapsulation of natural phenolic compounds; A review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829.
- Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M., and Zhang, H. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(*+) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Neves, A.R., Lucio, M., Lima, J.L. and Reis, S. (2012). Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. *Current Medical Chemistry*, 9(11), 1663-1681.
- Neves, A. R., Queiroz, H. F., and Reis, S. (2016). Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 27-37.
- Nissen, S. E., Tuzcu, E.M., Schoenhagen, P., Brown, B.G., Ganz, P., Vogel, R.A., Crowe, T., Howard, G., Cooper, C.J., Brodie, B., Grines, C.L., and DeMaria, A.N. (2004). Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 291(9), 1071-1080.
- Olatunji, O. (2016). *Natural Polymers Industry Techniques and Applications*. Nigeria: Springer, 115-161
- Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., and Delikanli, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 393-396.
- Pack, K. (2006). Microspheres for Drug Delivery. In J. L. Abraham and P. Lee (Eds.), *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Vol 1: Biological and Biomedical Nanotechnology*. Illionis: Springer, 19-21.
- Pannu, N. and Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(2019), 2237-2251.
- Patil, P., Chavanke, D., and Wagh, M. (2012). A Review on Ionotropic Gelation Method: Novel Approach For Controlled Gastroretentive Gelispheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 27-32.
- Peng, H., Xiong, H., Lie, J., Xie, M., Liu, Y., Bai, C., and Chen, L. (2010). Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry*, 121(1), 23-28.
- Perrie, Y. and Rades, T. (2010). *Pharmaceutics: Drug Delivery and Targeting*. London: Pharmaceutical Press, 27-98.
- Pongjanyakul, T. and Rongthong, T. (2010). Enhanced entrapment efficiency and modulated drug release of alginate beads loaded with drug-clay intercalated complexes as microreservoirs. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 409-419.

- Prior, R., Wu, X., and 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), 4290-4302.
- Ranade, V. V. and Hollinger, M. A. (2004). *Drug Delivery Systems* (Second edition). USA: CRC Press, 71-97, 108-122.
- Rehm, B. H. A. (2009). *Alginates: Biology and Applications*. Berlin Heidelberg: Springer, 1-27, 41-53.
- Rein, M., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S., and Pinto, M. (2012). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602.
- Reis, R. L. and Neves, N. M. (2008). *Natural-based polymers for biomedical applications*. USA: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 106-128.
- Risch, S. (1995). Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In Risch SJ (Ed.), *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. Washington, USA: American Chemical Society, 2-7.
- Rosas, J., Grosso, C., Aldapa, C., Vargas, E., Marin, M., Ortiz, F., and Cortez, R. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food Research, International*, 102, 575-587.
- Roy, A. B., Bajpai, J., and Bajpai, A. K. (2009). Development of calcium alginate –gelatin based microspheres for controlled release of endosulfan as a model pesticide. *Indian Journal of Chemical Technology*, 16, 388-395.
- Ruotolo, R., Calani, L., Brighenti, F., Crozier, A., Ottonello, S., and Del Rio, D. (2014). Glucuronidation does not suppress the estrogenic activity of quercetin in yeast and human breast cancer cell model systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559, 62-67.
- Sagis, L. (2015). *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Waltham, USA: Elsevier, 70-124.
- Sahoo, N., Manchikanti, P., and Dey, S., (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*, 81(6), 462–471.
- Sanna, V. R. (2015). Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 531-536.
- Sanna, V., Siddiqui, I., Sechi, M., and Mukhtar, H. (2013). Resveratrol loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 10(10), 3871-3881.
- Saralkar, P. and Dash, A. (2017). Alginate Nanoparticles Containing Curcumin and Resveratrol: Preparation, Characterization, and In Vitro Evaluation Against DU145

- Prostate Cancer Cell Line. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 18(7), 2814-2823.
- Sekhar, E. R. (2014). Development of Sodium Alginate/(Lignosulfonicacid-g-Acrylamide) IPN Micro Beads for Controlled Release of an Anti-Malarial Drug. *Indian Journal of Advances in Chemical Science* , 2(3), 228-237.
- Sergides, C., Chirilă, M., Silvestro, L., Pitta, D. and Pittas A. (2016). Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Experimenatal and Therapeutic Medicine*, 11(1), 164–170.
- Shastri, V. (2003). Non-Degradable Biocompatible Polymers in Medicine: Past, Present and Future. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4(5), 331-337.
- Shebis, Y., Iluz , D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky , Z., and Yehoshua, Y. (2013). Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 643-649.
- Shi, T., Liou, L., Sadhukhan, P., Duan, Z., Novick, A., Hissong, J., and DiDonato, J. (2004). Effects of resveratrol on gene expression in renal cell carcinoma. *Cancer Biology and Therapy*, 3(9), 882-888.
- Sieman, E. and Creasy, L. (1992). Concentration of phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 49-52.
- Siepmann, J., Siegel, R. A., and Rat, M. J. (2012). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. New York: Springer, 23-47.
- Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Figueiredo, I. V., Gonçalves, A. R., and Veiga, F. (2006). Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 311(1), 1-10.
- Silva, P. T., Fries, L. L. M., Menezes, C. R., and Holkem, A. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304-1311.
- Singh, M. N., Hemant, K., Ram, M., and Shiva, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences* , 5(2), 65-77.
- Sipos, P. (2008). *Formulation Optimization of Ammonio Methacrylate Copolymer Based Sustained Release Microspheres*. PhD Thesis, Szeged: University of Szeged, Faculty of Pharmacy.
- Soldati, P.P., Polonini, H.C., Paes, C.Q., Restrepo, J.A.S, Creczynksi-Pasa, T.B., Chaves, M.G.A.M., Brandao, M.A.F., Pittella, F., and Raposo, N.R.B. (2018). *Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect*. IFAC Conference Paper Online, (51)27, 16-21.
- Soleas, G., Diamandis , E., and Goldberg , D. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? and gone? . *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91-113.

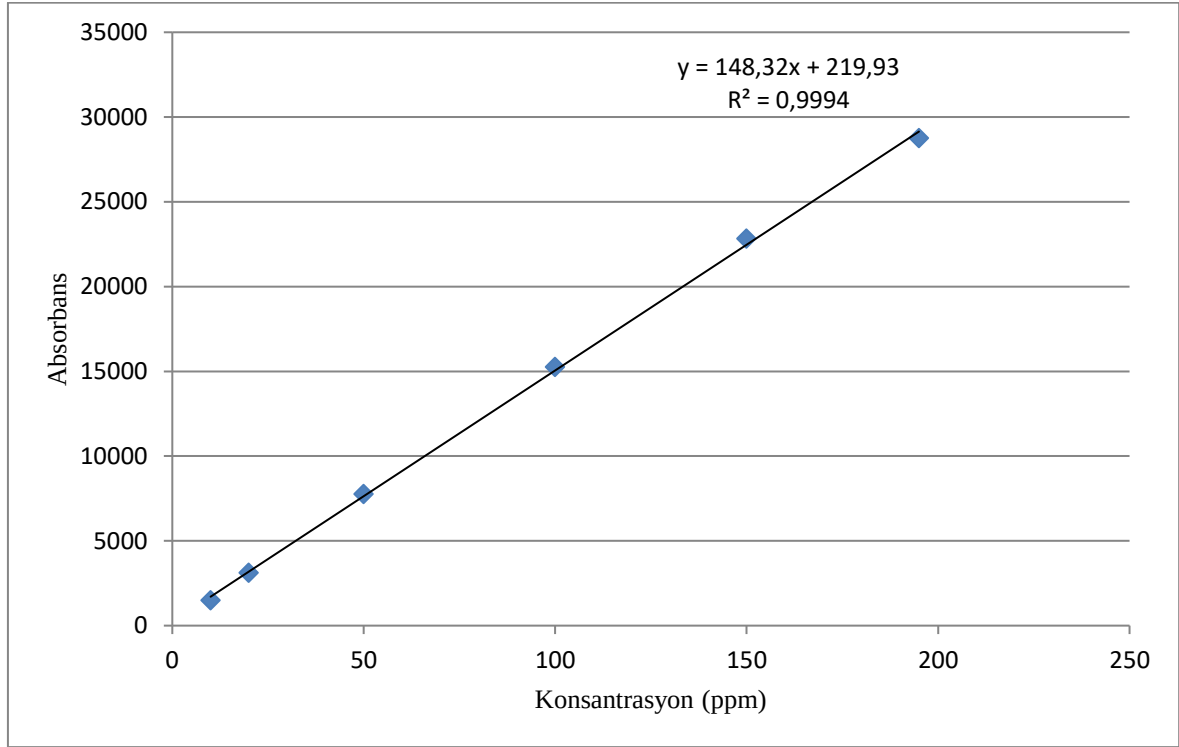
- Sousa Cardoso, T. (2017). *Microencapsulation of Resveratrol with applicability in food industry*. Master's Thesis, Porto: University of Porto, Chemical Engineering Department.
- Spigoni, V., Mena, P., Fantuzzi, F., Tassotti, M., Brighenti, F., Bonadonna, R., and Cas, A. (2017). Bioavailability of Bergamot (Citrus bergamia) flavanones and biological activity of their circulating metabolites in human pro-angiogenic cells. *Nutrients*, 9(12), 1328.
- Srivastava, A., Yadav, T., Sharma, S., Nayak, A., Kumari, A., and Mishra, N. (2016). Polymers in Drug Delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, 69-84.
- Syngletary, K., Jackson, S., and Milner, J. (2005). *Preventive Nutrition: the Comprehensive Guide for Health Professionals*. New Jersey: Humana Press, 55-88.
- Takaoka, M. (1939). Resveratrol, a new phenolic compound, from Veratrum grandiflorum. *Journal of the Chemical Society of Japan*, 60, 1090-1100.
- Thakur, V. K. and Thakur, M. K. (2015). *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies*. USA: Scrivener Publishing LLC and Wiley, 173-190.
- Thies, C. (1996). A survey of microencapsulation processes. In S. Benita (Ed.), *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. New York: Marcel Dekker, 119-132
- Tsume, Y., Incecayir, T., Song, X., Hilfinger, J., and Amidon, G. (2014). The development of orally administrable gemcitabine prodrugs with D-enantiomer amino acids: Enhanced membrane permeability and enzymatic stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(3), 514-523.
- Tu, L., He, Y., Yang, H., Wu, Z., and Yi, L. (2015). Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated Bacillus subtilis SL-13 by emulsification/internal gelation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(12), 735-749.
- Vastano, B., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.T., Zhou, Z., and Rosen, R. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of Polygonum cuspidatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 253-256.
- Vladimir-knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., and Babac, M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In V. Rao (Ed.), *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Rijeka, Croatia: InTech, 55-79, 147-180.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M., and Oatis, J. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32 (12), 1377-1382.
- Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 9-15.

- Wang, W., Zhang, L., Chen, T., and Guo, W. (2017). Anticancer Effects of Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles on Human Breast Cancer Cells. *Molecules*, 22(11), 1814-1824.
- Wang, S. W. (2017). Tissue distribution of trans-resveratrol and its metabolites after oral administration in human eyes. *Journal of Ophthalmology*.
- Wenzel, E. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition Food Research*, 49(5), 472–481.
- Wu, H., Li, G. N., Xie, J., Li, R., Chen, Q. H., Chen, J. Z., Wei, Z. H., Kang, L. N., and Xu, B. L. (2016). Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ros/erk/tgf-beta/periostin pathway in stz-induced diabetic mice. *BMC Cardiovascular Disorders*, 16(5).
- Yang, Y., Chung, T. S., and Ping Ng, N. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22(3), 231-241.
- Young, I. S., and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Young CR, Koleng, J. J., and McGinity, J. W. (2002). Production of spherical pellets by a hot-melt extrusion and spheronization process. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), 87-92.
- Zaman, M., Qureshi, J., Ejaz, H., Sarfraz, R. M., Khan, H. U., Sajid, F. R., and Rahman, M. S. (2016). Oral controlled release drug delivery system and Characterization of oral tablets; A review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*, 2(1), 67-76.

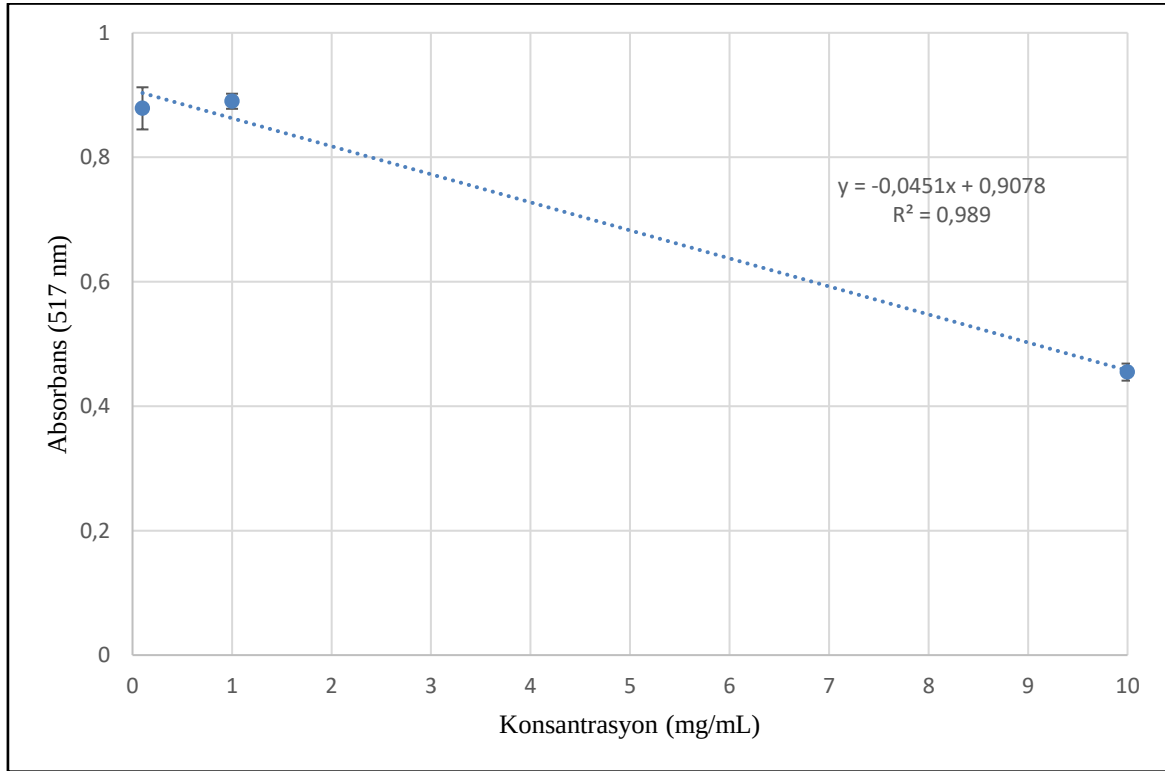




EK-1. Resveratrol kalibrasyon grafiği (HPLC)



EK-2. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (0,1 mg/mL; 1 mg/mL; 10 mg/mL) resveratrolün 517 nm’de verdiği kalibrasyon grafiği (DPPH)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SİNAN, Büşra
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.09.1990, İstanbul
 e-mail : busrasinann@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/İleri Teknolojiler Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Fatih Üniversitesi / Genetik ve Biyomühendislik	2011
Lise	Üsküdar Halide Edip Adıvar Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-	-	-

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Sinan, B., Kondolot Solak, E., Sağdıçoğlu Celep, A.G. (2019). *Health Benefits and Microencapsulation of Resveratrol*. I. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi'nde sunuldu, Ankara.

Hobiler

Yüzme, Basketbol, Tiyatro



GAZİ GELECEKTİR..