



**GALLİK ASİT YÜKLÜ MİKROKÜRELERİN KOLON KANSERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Aslıhan DEMİRKAYA

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

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Aslıhan DEMİRKAYA tarafından hazırlanan “GALLİK ASİT YÜKLÜ MİKROKÜRELERİN KOLON KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi İLERİ TEKNOLOJİLER Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Beslenme ve Diyetetik Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

.....

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

Başkan: Prof. Dr. Evrim Arzu KOÇKAYA

Patoloji Laboratuvar Teknikleri Bölümü, Gazi Üniversitesi

.....

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

Üye: Doç. Dr. Ilgaz AKATA

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

.....

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

Tez Savunma Tarihi: 26/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın 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 çalışmasında;

- 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 çalışmasında 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.

Aslıhan DEMİRKAYA
26/07/2019

GALLİK ASİT YÜKLÜ MİKROKÜRELERİN KOLON KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Aslıhan DEMİRKAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Polifenoller her molekülde birden fazla fenol grubu taşıyan bileşikler olup sebze, meyve, kuru baklagiller, çay, kahve gibi birçok gıdada bulunur. Polifenoller kardiyovasküler, nörodejeneratif ve kanser gibi birçok hastalığa karşı olumlu etkilerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Ayrıca polifenoller yüksek antioksidan özelliklerinden dolayı sağlık açısından büyük öneme sahiptir. Polifenollerin tanenler grubunun bir üyesi olan gallik asit (3,4,5-trihidroksi-benzoik asit) (GA) güçlü bir antioksidandır. GA'nın birçok çalışmada çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi kanıtlanmıştır. Bunlara ek olarak yara iyileşmesi, antiviral, antifungal, antibakteriyel, antimitojenik gibi birçok yararlı etkiye de sahiptir. Mikroküreler etken maddenin polimer matris içerisinde hapsedildiği, boyutları 1-1000 µm arasında değişen taşıyıcılardır. Etken maddenin hedef bölgeye ulaşması aşamasına kadar madde ve aktivite korunarak hedef bölgede kontrollü bir salım profili amaçlanır. Bu çalışmada GA, doğal bir polimer olan NaAlg ile su/yağ/su emülsiyon yöntemi kullanılarak GA/NaAlg oranı 1/1-1/8 arasında değişen formülasyonlarda mikroküreler oluşturulmuş ve çapraz bağlayıcı olarak CaCl₂ kullanılmıştır. Elde edilen mikrokürelerin küre verimleri %15,55-80,27; tutuklama verimleri %11,26-72,64 arasında değişmektedir. Mikrokürelerin salım çalışmaları pH 7.4'te gerçekleştirilmiştir. Optimum mikroküre oluşturma şartları GA/NaAlg oranı 1/8 ve çapraz bağlama süresi 30 dk. olarak belirlenmiştir. Oluşturulan mikrokürelerin GA'yı tutukladığı ve kontrollü bir salım profili sergilediği görülmüştür. Mikrokürelerin karakterizasyonunda SEM, DSC, XRD, FTIR analizleri kullanılmıştır. Mikroküreler içindeki GA'nın antioksidan aktivitesini koruduğu DPPH metodu ile ve antikanser aktivite özelliğini koruduğu Caco-2 hücreleri üzerinde MTT analizi ile gösterilmiştir. Yardımcı ve tamamlayıcı tedavilerde kullanılma potansiyeli yüksek olan GA yüklü NaAlg mikroküreler ile ilgili gerekli diğer çalışmalarının yapılması insan sağlığı ve ülke ekonomimiz için oldukça önemli olduğu değerlendirilmektedir.

Bilim Kodu : 20308

Anahtar Kelimeler : Mikroküre, gallik asit, kontrollü salım, polifenol, kanser

Sayfa Adedi : 69

Danışman : Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

EFFECTS OF GALLIC ACID LOADED MICROSPHERES ON COLON CANCER

(M. Sc. Thesis)

Aslıhan DEMİRKAYA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Polyphenols are compounds that contain more than one phenol group per molecule and are found in several foods. Polyphenols are of great interest due to their beneficial effects against many diseases such as cancer. In addition, polyphenols are of great importance for health due to their high antioxidant properties. Gallic acid (GA), which is a powerful antioxidant, has anticancer properties on various cancer cells. Microspheres are carriers varying in size from 1-1000 μm , where active substance is trapped in polymer matrix. Controlled release profile is aimed at target region by preserving loss of substance and activity until active substance reaches target region. In this study, GA containing microspheres were formed with NaAlg which is a natural polymer in formulations with GA/NaAlg ratio of 1/1-1/8 by using water/oil /water emulsion method, and CaCl_2 was used as a crosslinker. Microsphere yields of obtained microspheres were 15,55-80,27%; arrest efficiencies ranged from 11,26-72,64%. Release studies of microspheres were performed at pH 7.4. Optimum microsphere forming conditions were determined as GA/NaAlg ratio 1/8, crosslinking time 30 min. Microspheres formed were found to arrest GA and exhibit a controlled release profile. Microspheres were characterized by SEM, DSC, XRD, FTIR analysis. It was demonstrated by DPPH method that GA retained antioxidant activity in microspheres and that retain anticancer activity by using MTT analysis on Caco-2 cells. It is considered that important to carry out other necessary studies on GA loaded NaAlg microspheres which have high potential to be used in adjunct and complementary therapies.

Science Code : 20308

Key Words : Microsphere, gallic acid, controlled release, polyphenol, cancer

Page Number : 69

Supervisor : Assoc. Prof. Advie Gulcin SAGDICOGLU CELEP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini, bilgi birikimlerini ve tecrübelerini esirgemeyen, beni yönlendiren ve bu çalışmanın gerçekleşebilmesine imkân sağlayan, her konudaki destek ve emekleri için çok değerli hocam Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP'e,

Tez çalışmamın en önemli kısmı mikroküre oluşturma aşamasındaki paylaştığı destek, bilgi, birikimleri için ve bu aşamayı gerçekleştirebilmemde gerekli ortamı sağladığı, laboratuvarının kapılarını açtığı için çok değerli hocam Doç. Dr. Ebru KONDOLOT SOLAK'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımları ve emekleri için değerli arkadaşım Seçil KAYA'ya,

Bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için gerekli ekonomik desteği bir yüksek lisans bilimsel araştırma projesi kapsamında 47/2017/13 proje kodu ile desteklediği için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Bu çalışmada gerekli bazı analizlerin sonuçlandırılmasındaki hizmetleri için Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne, ODTÜ Merkez Laboratuvarı'na, Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji Ankara Ofisi'ne,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de sonsuz destek, emek ve sabırları için çok değerli babam Birol YEŞİLYURT'a, annem Sevgi YEŞİLYURT'a, kardeşlerim Neslihan YEŞİLYURT'a, Kadir YEŞİLYURT'a ,

Her konudaki ilgi ve desteğiyle her zaman yanımda olup bana güç veren değerli eşim Yasin DEMİRKAYA'ya,

Teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kontrollü Salım Sistemleri	3
2.1.1. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Kontrollü salım sistemlerinin kullanım alanları	7
2.2. Mikroküreler	10
2.2.1. Mikroküre türleri	11
2.2.2. Mikroküre oluşturma yöntemleri	13
2.2.3. Mikrokürelerin avantajları ve dezavantajları	14
2.2.4. Mikrokürelerde sodyum aljinatın kullanılması	15
2.3. Polifenoller ve Gallik Asit	18
2.3.1 Polifenoller	18
2.3.2. Gallik asit	21
2.3.3. Gallik asit taşıyan kontrollü salım sistemleri	25
3. MATERYAL/METOT	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	29
3.1.2. Cihazlar	29

	Sayfa
3.2. Metot.....	30
3.2.1. Kalibrasyon çalışmaları.....	30
3.2.2. Mikrokürelerin hazırlanması.....	31
3.2.3. Tutuklama verimi çalışmaları.....	32
3.2.4. Salım çalışmaları.....	33
3.2.5. Mikrokürelerin denge su içeriği tayini.....	33
3.2.6. Çapraz bağ yoğunluğu hesabı.....	34
3.2.7. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi.....	35
3.2.8. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) analizi.....	35
3.2.9. X-Işını difraktometre (XRD) analizi.....	36
3.2.10. Taramalı elektron mikroskopi (SEM) analizi.....	36
3.2.11. Antioksidan aktivite çalışmaları.....	36
3.2.12. Sitotoksisite çalışmaları.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4.1. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi.....	39
4.2. Gallik Asit Yüklü Mikrokürelerin Verim Hesabı.....	40
4.3. Mikrokürelerde Gallik Asidin Tutuklanma Verimi.....	41
4.4. Gallik Asidin Mikrokürelerden Kontrollü Salımı.....	42
4.5. Mikrokürelerin Denge Su İçeriği Tayini Sonuçları.....	43
4.6. Mikrokürelerin Çapraz Bağ Yoğunluğu Sonuçları.....	44
4.7. Mikrokürelerin DSC Termogramları.....	47
4.8. Mikrokürelerin FTIR Spektrumları.....	49
4.9. Mikrokürelerin XRD Eğrileri.....	51
4.10. Mikrokürelerin SEM Görüntüleri.....	53
4.11. Mikrokürelerin Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	55
4.12. Mikrokürelerin Sitotoksisite Çalışmaları.....	56

Sayfa

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kontrollü salım sistemlerinin klasik tedavilerle karşılaştırılması	4
Çizelge 2.2. Gallik asit ester türevleri.....	22
Çizelge 2.3. Gallik asidin bazı kanser türleri üzerindeki etkileri.....	24
Çizelge 3.1. Mikrokürelerin hazırlanma koşulları	32
Çizelge 4.1. Hazırlanan mikrokürelerin verimi	41
Çizelge 4.2. Mikrokürelerin % tutuklama verimi	42
Çizelge 4.3. Mikrokürelerin denge su içeriği.....	44
Çizelge 4.4. Çapraz bağ yoğunluğu sonuçları	45

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Membran sistemlerin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2. Matris sistemlerin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.3. Erozyona uğrayan sistemlerin şematik gösterimi	6
Şekil 2.4. Asılı zincir sistemlerin şematik gösterimi	6
Şekil 2.5. Şişme kontrollü sistemlerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.6. Osmotik kontrollü sistemlerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.7. Su-yağ-su emülsiyon yöntemi şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.8. Mikroküre oluşturma yöntemleri.....	14
Şekil 2.9. <i>Laminaria digitata</i>	16
Şekil 2.10. NaAlg ile oluşturulan polimerin yapısı.....	16
Şekil 2.11. NaAlg'ın moleküler yapısı	17
Şekil 2.12. Kalsiyum ve aljinatın oluşturduğu etkileşimin şematik gösterimi	17
Şekil 2.13. Bitki kimyasallarında GA'nın yeri	19
Şekil 2.14. GA'nın bitkilerde biyosentezi	20
Şekil 2.15. Gallik asit molekül yapısı	21
Şekil 2.16. GA'nın kanser gelişimini önlemede etkili olduğu bazı yollar	23
Şekil 3.1. Kullanılan mikroküre oluşturma yönteminin aşamalarının şematik gösterim	31
Şekil 3.2. Serbest DPPH radikali	37
Şekil 3.3. Bir serbest radikal (X) ile DPPH'in reaksiyonu	37
Şekil 3.4. MTT reaksiyonu	38
Şekil 4.1. GA UV-Vis spektrumu.....	39
Şekil 4.2. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	40
Şekil 4.3. Mikrokürelere GA'nın kümülatif salım grafiği	43
Şekil 4.4. Gallik asit DSC termogramı	47

Şekil	Sayfa
Şekil 4.5. Mikrokürelerin DSC termogramları.....	48
Şekil 4.6. Mikrokürelerin FTIR spektrumları.....	50
Şekil 4.7. Gallik asit XRD eğrisi.	52
Şekil 4.8. Mikrokürelerin XRD eğrisi..	53
Şekil 4.9. DPPH % inhibisyon sonuçları	56
Şekil 4.10. D2 formülasyonlu mikrokürelerin 24 saatlik MTT analizi sonuçları.....	57
Şekil 4.11. D2 formülasyonlu mikrokürelerin 48 saatlik MTT analizi sonuçları.....	57

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. E2 formülasyonlu bir mikrokürenin SEM görüntüsü	54
Resim 4.2. D2 formülasyonlu bir mikrokürenin SEM görüntüsü.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
dk.	Dakika
g.	Gram
kV	Kilo volt
mg.	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
N	Normal
nm	Nanometre
Sa	Saat
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

A549	İnsan akciğer kanser hücre hattı
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CD	Siklodekstrin
CH ₄	Metan
CO ₂	Karbondioksit
GA	Gallik asit
dH ₂ O	Distile su
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
H-82	İnsan küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı

Kısaltmalar**Açıklamalar****H₂O**

Su

HeLa

İnsan serviks kanseri hücre hattı

HepG2

İnsan karaciğer kanseri hücre hattı

HFF

İnsan üst deri fibroblast hücre hattı

HT-29

İnsan kolon kanser hücre hattı

KV

Küre verimi

MCF-7

İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı

MDBK

Madin-Darby sığır böbrek hücre hattı

MTT

Metil tiyazol tetrazolium

NaAlg

Sodyum aljinat

NIH/3T3

Fare embriyonik fibroblast hücre hattı

NMR

Nükleer manyetik rezonans

PCL

Poli ε kapro lakton

PHA

Poli hidroksi alkanat

PLA

Poli laktik asit

PLGA

Poli laktik ko-glikolik asit

PSD

Parçacık büyüklüğü dağılımları analizi

PVP

Poli vinil prolidon

RSA

Radikal süpürme aktivitesi

ROS

Reaktif oksijen türleri

SEM

Taramalı elektron mikroskopi

Tg

Camsı geçiş ısısı

TGA

Termogravimetrik analiz

TV

Tutuklama verimi

UV

Ultraviyole

X-RPD

X-Işını toz kırınımı

XRD

X-Işını difraktometre

1. GİRİŞ

Mikroküre teknolojisi kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde veya yardımcı/tamamlayıcı tedavilerde son dönemlerde oldukça rağbet gören bir teknolojidir. Bu teknoloji ile ilaçların veya diğer yardımcı maddelerin hedef olmayan bölgelerde çözünmesi minimuma indirilerek yan etki veya etken madde kayıpları azaltılmakta, istenen bölgeye uygun dozda ulaşması istenen maddenin ulaşabilmesi için alınan fazla doz engellenmektedir. Aynı zamanda ilacın veya diğer yardımcı maddenin hazırlanma sürecinde maruz kaldığı koşullar nedeniyle aktivite kaybı vb. durumlardan korumaktadır. Bu nedenlerle bölgeye özgü uygulamalarda yüklenen maddenin sadece istenilen bölgede çözünmesi ve aniden salım yerine kontrollü bir salım sağlanır.

Kontrollü salım sistemleri tarım, eczacılık, gıda mühendisliği, tıp ve kimya alanları gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Tarımda topraktaki besin miktarının kontrolü ve kimyasal gübrelerin zararlı etkilerinin önüne geçme amacıyla gübrelemede [1] ve pestisitlerin etki alanını kontrol etmek, aşırı dozların önüne geçmek, tarım alanlarının daha verimli kullanılmasını sağlamak amaçlı kullanılır [2]. Eczacılıkta ilaçların toksisitesini azaltmak, ilacın aktif olacağı bölgede salımını sağlayarak yan etkilerin önüne geçmek, çeşitli tedaviye yardımcı maddeler veya ilaçları birlikte kullanmak amaçlı kullanılır [3]. Gıda mühendisliğinde gıdaların insan sağlığına olumlu etkilerinin korunması, raf ömrünün uzatılması ve oksidasyondan korunması amaçlı kullanılmaktadır [4]. Kimya alanında örneğin kozmetik sanayide kullanılan kozmetik ürünlerinin uzun süreli işlemler ve yüksek sıcaklıktan korumak vb. amaçlarla kullanılmaktadır [5]. Tıp alanında örneğin gerekli hormonların biyoyararlanımını ve etkinliğini artırmak amaçlı kullanılması gibi birçok örnek mevcuttur [6].

Çeşitli kanser tedavilerinde bazen ilaçların taşınması bazen de antikanserojen etkisi olduğu bilinen maddelerin veya ekstrelerin mikroküre teknolojisiyle gerekli olduğu bölgenin hedeflenmesinde kullanılmıştır.

Etken madde taşıyıcısı olarak büyük önem arz eden mikrokürelerin oluşturulmasında biyobozunur polimerler yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyobozunur polimerler mikroorganizmalar tarafından biyodegradasyona uğrayarak CH₄, CO₂, H₂O, humus vb. gibi

kısmen çevreye zararsız birleşiklere dönüşürler [7]. Biyobozunur polimerlere örnek olarak jelatin, guar gum, aljinat, ligninler, adhezyon proteinleri, selüloz, dekstran, kitosan, poli laktik asit (PLA), poli kapro lakton (PCL), poli hidroksi alkanat (PHA) tercih edilmektedir. Bunların arasında sodyum aljinat ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) doğal bir biyobozunur polimerdir.

Sodyum aljinat 1,4- β -d-mannuronik ve α -l-glukuronik asitlerden oluşan doğrusal bir polisakkarit aljinik türevidir. Aljinatlar, biyoyumluluk ve jelleşme kolaylığı da dahil olmak üzere uygun özellikleri nedeniyle biyomedikal bilim ve mühendislikte çok tercih edilen bir biyomateryaldir. Yara iyileşmesi, ilaç verme ve doku mühendisliği uygulamalarında dokulardaki hücre dışı matrislere yapısal benzerliğe sahiptir ve çeşitli kritik roller oynamak için manipüle edilebilir yapıda olduklarından özellikle dikkat çekici olmuştur [8].

Enkapsülasyonu hedeflenen gallik asit, çeşitli gıdalarda bulunan bir organik asittir ve güçlü bir antioksidan olarak bilinir. Yaban mersini, ceviz, elma, keten tohumu gibi bitkiler ve çayların hepsi gallik asit içerir. Ayrıca gallik asit kuru fındık, sumak, meşe ağacı kabuğu, çeşitli bitkiler ve otlarda da bulunur. Gallik asit damar büzülmesini sağlayan astringent ve acı tada sahip bitkilerin polifenollerini olan tanenlerin bir parçası olarak da bulunur.

Gallik asidin birçok kanser türünde (lösemi, kolon, beyin, rahim ağzı, özofagus, melanoma, pankreas, ağız içi, prostat, mide, meme, akciğer) sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır [9-20].

Bu çalışmada gallik asidi taşıyan, onun kontrollü salımına izin veren ve biyoaktif özelliklerini koruyan, hidrofilik doğal bir biyopolimer sodyum aljinat etken maddeyi enkapsüle etmek için kullanılarak mikroküreler oluşturulmuştur. Polimerin çapraz bağlanmasında kalsiyum klorür (CaCl_2) kullanılmıştır. Kontrollü salımına imkân sağlayan mikrokürelerin oluşturulmasında su-yağ-su emülsiyon yöntemi kullanılmıştır.

Literatürde gallik asidin mikrokürelerden salımını inceleyen çalışmalar mevcuttur fakat bu tez çalışmasının diğerlerinden farkı ilk kez su-yağ-su emülsiyon yöntemi kullanılarak enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Ek olarak enkapsülasyon sonrası enkapsüle edilen gallik asidin antioksidan ve antikanserojen özellikleri de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrollü Salım Sistemleri

Kontrollü salım sistemleri, etken maddenin konsantrasyonunu sabit tutabilmek, klasik metotlardaki yüklenen dozun fazlalığından kaçınmak veya yetersizliğinin önüne geçmek amaçlı üretilmiş bir sistemdir [3]. Temel prensibi ilacın biyofarmasötik, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini optimize etmektir öyle ki yan etkileri ve doz sıklığını azaltarak en uygun yolla ve ilacın düşük miktarını kullanarak kısa sürede iyileşme ile etkinliği en üst düzeydedir (Çizelge 2.1.) [21-23]. İlk kontrollü salım sistemi formülasyonu, Smith Kline & French tarafından 1952'de dekstroamphetamin (Dexedrine®) taşınması ile yapılmıştır.

Kontrollü salım sistemleri tarım, eczacılık, gıda mühendisliği, tıp ve kimya alanları gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Tarımda topraktaki besin miktarının kontrolü ve kimyasal gübrelerin zararlı etkilerinin önüne geçme amacıyla gübrelemede [1] ve pestisitlerin etki alanını kontrol etmek, aşırı dozların önüne geçmek, tarım alanlarının daha verimli kullanılmasını sağlamak amaçlı kullanılır [2]. Eczacılıkta ilaçların toksisitesini azaltmak, ilacın aktif olacağı bölgede salımını sağlayarak yan etkilerin önüne geçmek amaçlı kullanılır [3]. Gıda mühendisliğinde gıdaların insan sağlığına olumlu etkilerinin korunması, raf ömrünün uzatılması ve oksidasyondan korunması amaçlı kullanılmaktadır [4]. Kimya alanında örneğin kozmetik sanayide kullanılan kozmetik ürünlerinin uzun süreli işlemler ve yüksek sıcaklıktan korunması amacıyla kullanılmaktadır [5]. Tıpta çeşitli tedavilerde gerekli hormonların biyoyararlanımını ve etkinliğini artırmak amaçlı kullanılması gibi birçok örnek mevcuttur [6].

Çizelge 2.1. Kontrollü salım sistemlerinin klasik tedavilerle karşılaştırılması

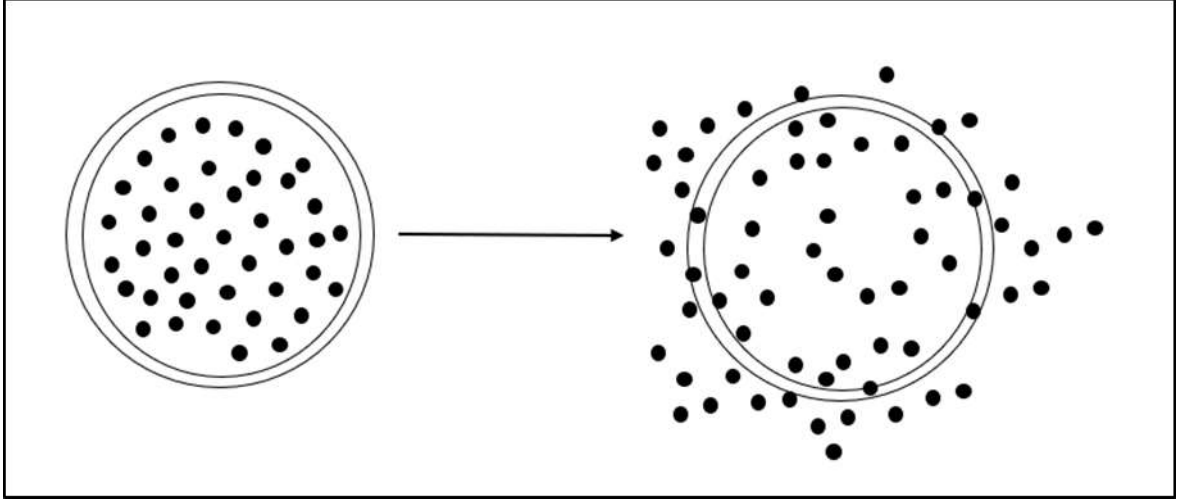
Kontrollü Salım Sistemlerinin Avantajları	Klasik Tedavi Yöntemlerinin Dezavantajları
Salınımı istenen bölgeye özgü hazırlanabilir	Bölgeye özgü değildir, sağlıklı hücreler de etkilenir.
Etkin doz enkapsüle edilerek gerekenden fazla doz kullanımı önlenmiş olur.	Etkin dozun etki etmesi gereken bölgeye ulaşabilmesi için fazla doz kullanılır.
Uzun ömürlü, biyouyumlu/biyobozunur, dayanıklılık, proses koşullarından korunma ve aktivite kayıpları önlediği için tekrarlar minimuma iner.	Etkin madde miktarının tekrarlanması gerekir.

2.1.1. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması

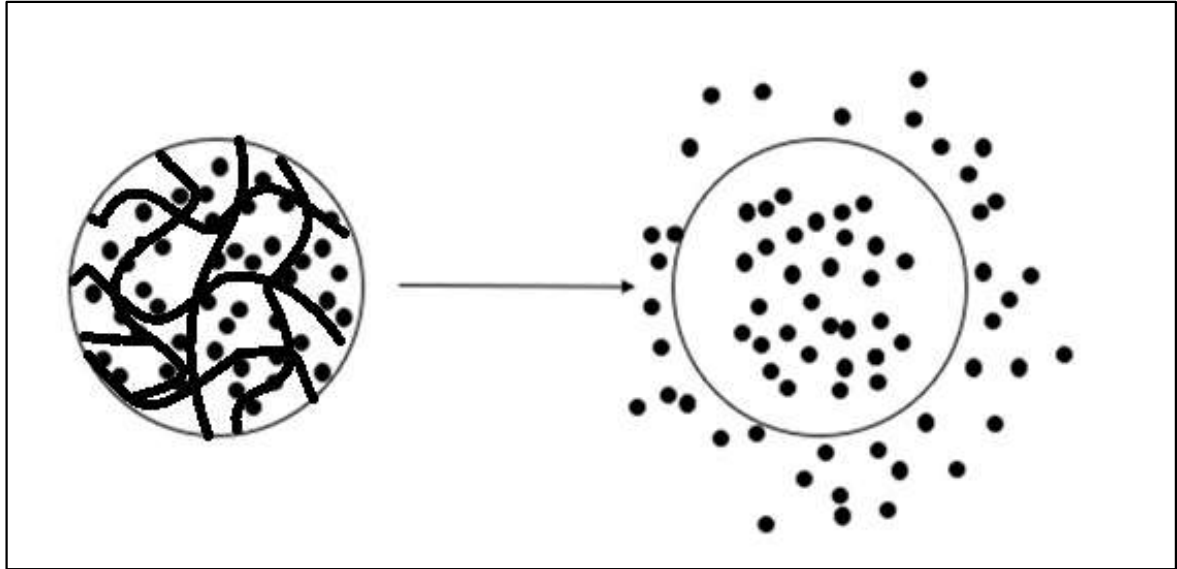
Kontrollü salım sistemlerinin birçok sınıflandırması mevcuttur. Salım mekanizmasına göre değerlendirildiğinde 3 ana başlık altında incelenmesi mümkündür:

- 1- Difüzyon kontrollü sistemler
- 2- Kimyasal kontrollü sistemler
- 3- Çözücünün harekete geçirdiği sistemler

Difüzyon kontrollü sistemlerde enkapsüle edilen madde suda çözünmeyen bir polimer ile oluşturulmuş sistemden difüzyon mekanizması ile kontrollü salınır. Bu sistem iki şekilde kurulabilir. İlki bir gözenekli ince zar benzeri polimerden bir yapı oluşturularak sistemin merkezinde etken madde hapsedilir. Sistem hedef bölgeye gönderildiğinde vücut sıvısı sistemin merkezine difüzlenererek etken maddeyi çözer ve hedeflenen bölgeye difüzlendir (Şekil 2.1.). Böyle sistemlere membran, depo veya rezervuar tipli sistemler denir. Bundan farklı olarak etken madde polimerde çözülmüş de olabilir. Hedef bölgedeki sıvı etken maddeyi çözerek difüzyon mekanizmasıyla sistemin dışına alabilir (Şekil 2.2.). Böyle sistemlere de matris (monolitik) sistem denir [24].

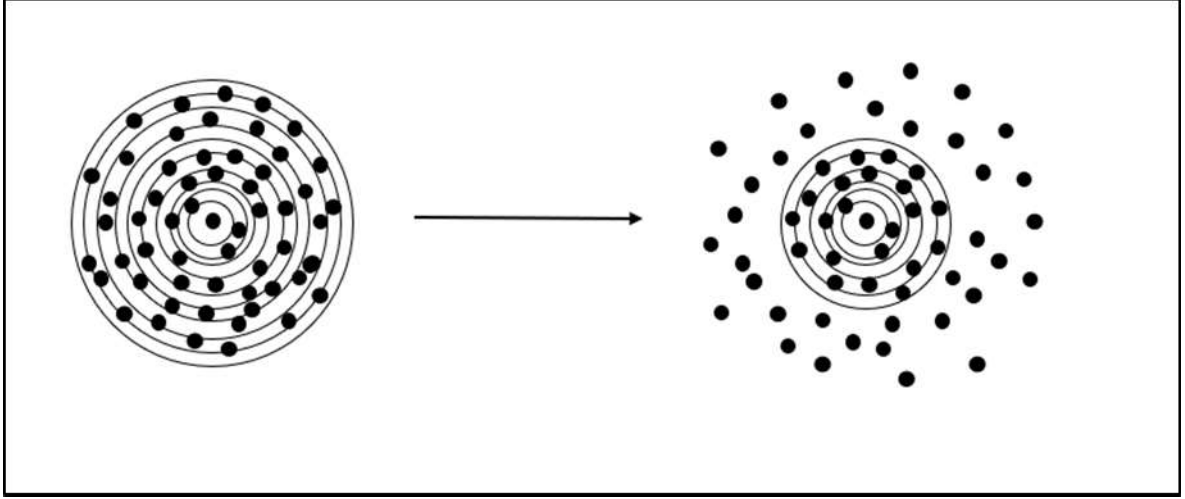


Şekil 2.1. Membran sistemlerin şematik gösterimi

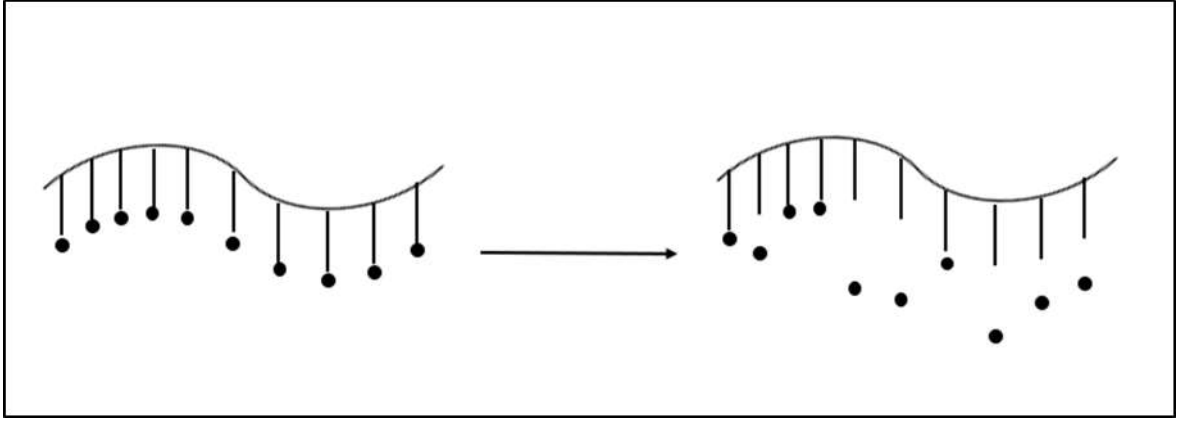


Şekil 2.2. Matris sistemlerin şematik gösterimi

Kimyasal kontrollü sistemlerinde salım, polimerin erozyona uğramasıyla (Şekil 2.3.) veya asılı zincir sistemlerde polimerle etken madde arasındaki bozulabilir bağların bozulmasıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.4.).

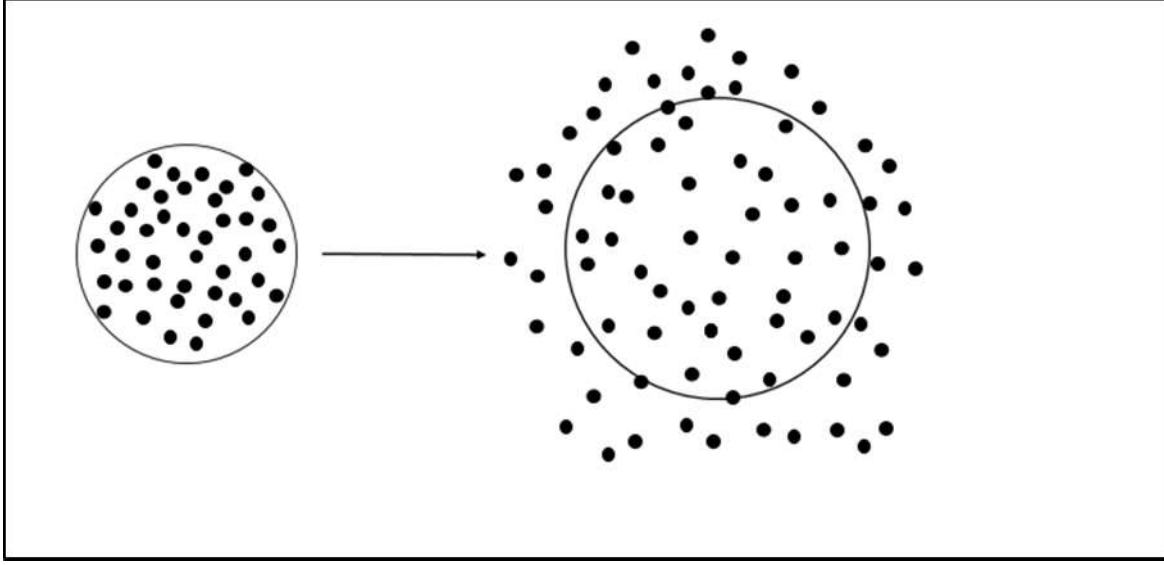


Şekil 2.3. Erozyona uğrayan sistemlerin şematik gösterimi

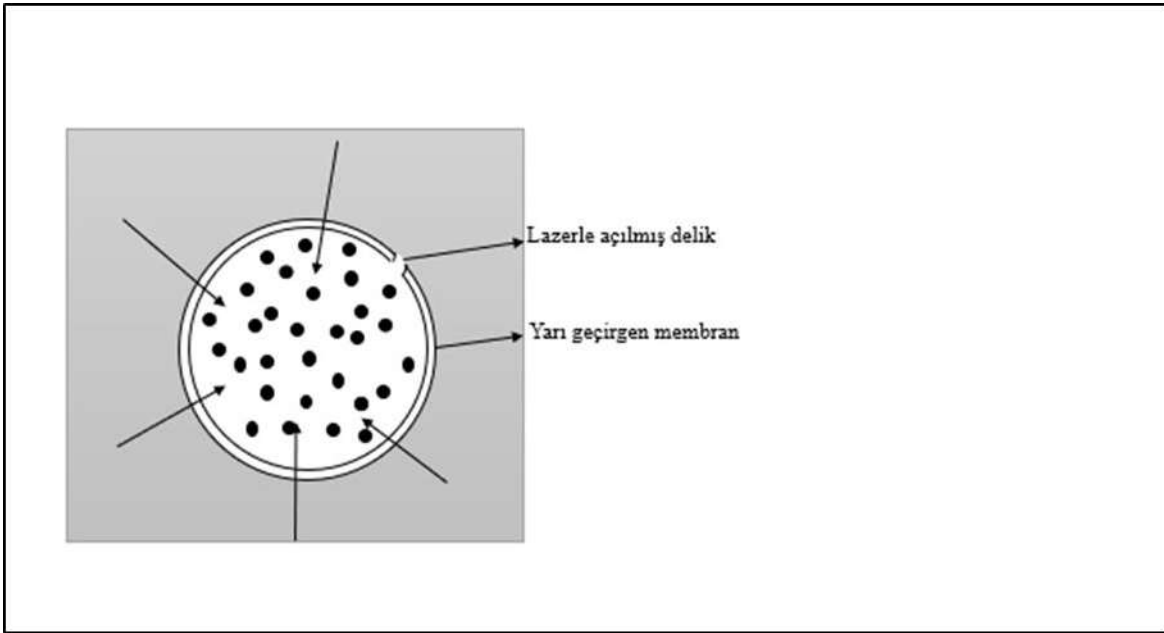


Şekil 2.4. Asılı zincir sistemlerin şematik gösterimi

Çözücünün harekete geçirdiği sistemler iki şekilde incelenir. İlki şişme kontrollü sistemler, polimerin şişmesiyle etken maddenin ortama salındığı sistemlerdir (Şekil 2.5.). Diğeri ise osmotik kontrollü sistemler olan suyun ya da ortamdaki sıvının etken maddenin içinde bulunduğu yarı geçirgen membrandan girerek çözünmesiyle kontrollü salımın sağlandığı sistemlerdir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.5. Şişme kontrollü sistemlerin şematik gösterimi



Şekil 2.6. Osmotik kontrollü sistemlerin şematik gösterimi

2.1.2. Kontrollü salım sistemlerinin kullanım alanları

Kontrollü salım sistemleri tıp, eczacılık, gıda, tarım ve hayvancılık gibi çeşitli alanlarda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır.

Tıp alanında çeşitli olumlu etkisi bilinen moleküllerden biyoyararlanımı ve onların etkinliğini artırmak amaçlı kullanılmaktadır.

Chaurasia ve arkadaşları 2006'da yayınladıkları çalışmalarında metotreksat içeren guar sakızıyla kaplanmış kolon bölgesinde bölgesel salım ile karakterize mikroküreler geliştirmiştir. Emülsifikasyon metodu kullanılarak ve çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılmış bu mikrokürelerin kolon bölgesine yeterli miktarda metotreksat taşıdığı ve bunun kolorektal kanserin kemoterapisi için etkili potansiyel bir sistem olduğu *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir [25].

Wary ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları çalışmalarına göre gallik asit taşıyan kitosanla enkapsüle edilmiş mikrokürelerin birleştirildiği kollajen bir matrisin bölgesel uygulamalarda iyileştirici bir ajan olarak kullanılabilceği kanıtlanmıştır. Bu çalışmada gallik asidin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin korunduğu ve hücrelerde toksik etki yaratmadığı gösterilmiştir. Geliştirilen sistemin yara iyileşmelerinde ümit vadeden bir biyomateryal olduğu ifade edilmiştir [26].

Maestrelli ve arkadaşlarının 2015'te yayınladıkları çalışmalarında kolon kanserinde anti-inflamatuar etkisi bilinen ketoprofenin antioksidan özelliği bilinen askorbik asitle kombinasyonu Caco-2 hücre serisinde kullanılmak üzere mikroküreler oluşturulmuştur. Bu oluşumda hidrofilik biyopolimer olan pektin, aljinat ve kitosan çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Sonuç olarak toksisite problemi aşılmış güvenli mikroküreler geliştirilmiş ve ketoprofenin askorbik asitle birlikte kullanımı için güçlü bir taşıma sistemi olarak böyle polimerik mikrokürelerin kullanımının mümkün olduğu gösterilmiştir [27].

Eczacılık alanında yapılan çalışmalarda ilaçların etkinliğini artırmak, bölgesel tedaviyi sağlamak ve olumlu etkileri bilinen moleküllerle kombinasyonu ile biyoyararlanımı artırmak yönünde ve daha nice amaçlarla kontrollü salım sistemleri kullanılmaktadır.

Muvaffak ve arkadaşlarının 2004'te yayınladıkları çalışmalarında kolşisinin kontrollü salımı için su-yağ-su emülsiyon yöntemi kullanılarak jelatinle kaplı, gluteraldehit ile çapraz bağlanmış mikroküreler oluşturulmuştur. Çapraz bağlayıcı koşulları değiştirilerek salım kontrol edilmiştir. MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı), HeLa (İnsan serviks kanseri hücre hattı) ve H-82 (İnsan küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı) hücre hatlarında sitotoksitesi kontrol edilen bu mikrokürelerin bölgesel kemoterapi uygulaması için umut vadeden sistemler olduğu bildirilmiştir [28].

Olukman ve arkadaşlarının 2012’de yayınladıkları çalışmalarında bir kanser ilacı olan 5-Fluorourasili içeren mikroküreler oluşturulmuştur. Bu oluşturulan mikrokürelerden ilacın salımı farklı çapraz bağlayıcılarla ve kullanılan polimerlerin farklı oranlarıyla kontrol edilmiştir. Böylelikle hedef olmayan bölgelerde salımı azaltılmış ve ilacı kanda terapötik düzeyde tutabilmeyi sağlamış bir sistem geliştirilmiştir [29].

Zhang ve arkadaşlarının 2018’de yayınladıkları çalışmalarında antikanser aktivitesi bilinen paklitaksel molekülü çift emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu kullanarak PLGA mikroküreleri içine enkapsüle edilmiş ve kanser terapilerindeki etkisi hem *in vitro* hem *in vivo* değerlendirilmiştir. Sonuç olarak oluşturulan sistemin tümörü inhibe edebilecek, ilaç uygulama sıklığını azaltacak ve ilacın yan etkilerini azaltacak kötü huylu glioma için umut vadeden bir tedavi hizmeti sunabileceği ifade edilmiştir [30].

Gıda, tarım ve hayvancılıkta toprak verimini artırma, pestisit kullanımını azaltma, kimyasal gübrelerin zararlı etkilerinin önüne geçilmesi, gıdaların raf ömrünün uzatılması, gıdalardan en iyi biyoyararlanımı elde etme vb. amaçlarla kontrollü salım sistemleri kullanılmaktadır.

Bora ve arkadaşlarının 2018’de yayınladıkları çalışmalarında kontrollü salım sistemi olarak mikroküreler, probiyotiklerin taşınmasında kullanılmıştır. Peynir altı suyu protein izolatu ve fruktooligosakkaritler farklı oranlarda kullanılarak *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* probiyotikleri dondurularak kurutulup mikroenkapsüle edilmiştir. Bu iki probiyotik ideal bir besin kaynağı olan muz tozu içine dahil edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen sistem 4°C’lik depolama koşulunda canlılığını korumuş, gastrointestinal koşullar altında serbest hücrelerden anlamlı bir şekilde daha fazla enkapsüle edilen bakteri hücrelerinin mevcut olduğu belirlenmiştir. Böylelikle oluşturulan mikrokapsüllerin canlı probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını ve bağırsak içine güvenle taşınmasını sağlamak için umut verici bir sistem olduğu sonucuna varılmıştır [31].

Beshbishy ve arkadaşlarının 2019’da yayınladıkları çalışmalarında Babesia ve Theileria parazitlerine karşı etkili bir aşı olmamasından ötürü antioksidan, antibakteriyel ve antimalarial etkileri bilinen bir polifenol elajik asidi β -siklodekstrinle nanopartiküller haline getirilerek ağır antiprotozoal ilaçlar yerine alternatif bir antiparazitik ajan olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Madin-Darby sığır böbrek (MDBK), fare embriyonik fibroblast

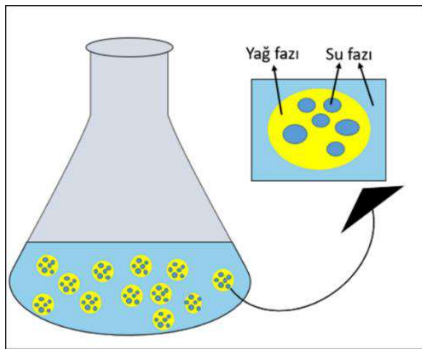
(NIH/3T3) ve insan üst deri fibroblast (HFF) hücre kültürü sitotoksisite çalışmalarıyla da desteklenmiştir [32].

Niizawa ve arkadaşları 2019'da yayınladıkları çalışmalarında doğal astaksantin enkapsülasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu molekül mikroalglerden temin edilmektedir ve E vitamini veya β -karoten'den daha güçlü bir antioksidan molekül olup yüksek kararsızlıkta olması nedeniyle fonksiyonel gıda geliştirilmesi uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu nedenle mikroenkapsülasyon teknolojisine başvurulmuştur. Astaksantin aljinat ile dış jelasyon yöntemi uygulanarak enkapsüle edilmiş, çapraz bağlayıcı olarak CaCl_2 kullanılmıştır [33].

2.2. Mikroküreler

Mikroküreler, etken maddenin partiküller içinde 1-1000 μm partikül büyüklüğü ile moleküler veya makroskopik seviyede dağıldığı bir veya daha fazla karışabilir polimerin sürekli fazından oluşan yapılardır [34].

Mikroenkapsülasyon, bir polimer matris içine biyoaktif bir maddenin veya maddelerin hapsedilmesi temeline dayanan, enkapsüle edilen maddelerin maruz kalacağı endüstriyel süreçlerde bozulmadan ve antioksidatif etki gibi sahip oldukları birçok biyoaktif özellikleri azalmadan veya yok olmadan, etkili olacağı bölgeye ulaşmasını sağlayan bir yöntemdir (Şekil 2.1.). Geleneksel veya hemen salınan formlarına alternatif olarak kontrollü dozaj formlarının her zaman daha etkili oldukları kanıtlanmıştır. Bu formlar yan etkileri en aza indirmek, faydaları en üst seviyeye çıkarmak, bir etken maddeyi vücuda önceden belirlenmiş bir şekilde vermenin sayısız avantajını sunmaktadır. Son zamanlarda mikroküreler ilaçları, aşıları, antibiyotikleri ve hormonları kontrollü bir şekilde taşımakta görevlendirilmiştir [21].



Şekil 2.7. Su-yağ-su emülsiyon yöntemi şematik gösterimi

Bu teknoloji ile,

Maddelerin hedef olmayan bölgelerde çözünmesi minimuma indirilerek yan etkiler veya gereksiz madde kayıpları azaltılmakta, istenen bölgede uygun dozda ulaşması istenen maddenin ulaşabilmesi için alınan fazla doz miktarı engellenmektedir. Aynı zamanda hazırlanma süreçlerinde taşınan madde çevre koşulları nedeniyle bozulmalardan veya aktivite kayıplarından da korunmaktadır.

Mikroküre teknolojisi bölgeye özgü aktivite için kullanılarak yüklenen maddenin sadece istenilen bölgede çözünmesini hedef alır. Çeşitli kanser tedavilerinde bazen ilaçların taşınması bazen de antikanserojen etkisi olduğu bilinen maddeler veya ekstrelerin mikroküre teknolojisiyle sadece tedavinin gerekli olduğu bölgenin hedeflenmesinde kullanılır.

İdeal mikrokürelerin özellikleri şöyledir:

- İlacın makul dozdaki bir miktarını taşıyabilme,
- Hazırlanan mikrokürenin klinik olarak kabul edilebilir raf ömrü ve stabilitesi,
- Enjeksiyon için sulu taşıyıcı sistemlerde kontrollü parçacık büyüklüğü ve dağılılabirlik,
- Geniş bir zaman aralığında aktif ajanın salımının iyi bir kontrolü,
- Kontrol edilebilir bir biyobozunurluk ile biyoyumluluk,
- Kimyasal modifikasyona duyarlılık [35].

2.2.1. Mikroküre türleri

Mikroküre türleri aşağıdaki gibidir [21, 35, 36]:

Biyoadhezif mikroküreler

Hedef bölgeye yapışarak, uzun süreli etken madde salımını sağlayan mikrokürelerdir [37].

Manyetik mikroküreler

Embolik oklüzyon üretmeksizin (4 μm 'den daha küçük) kapiller aracılığıyla dolaşmaya yetebilecek kadar küçük süper moleküler partiküllerdir. Ayrıca 0,5-0,8 tesla manyetik alan ile bitişik dokuların içine sürüklenebilen ve mikro damarlarda kontrol edilebilecek ferromanyetik duyarlı mikrokürelerdir. Sulu taşıyıcılarla taşınır ve 16-18 numara iğneler ile enjekte edilebilir boyutlarda kapsüllenmiş küresel serbest akışlı parçacıklardır [38].

Yüzen mikroküreler

Midede çok üniteli dozaj formlarının homojen dağılımı nedeniyle ve tahriş riskini azaltmaları nedeniyle dikkat çekmektedir. Yalnızca midede çözünen ilaçların güçlendirilmiş absorpsiyonunu sağlar. Gastrik sıvılarda yüzme kabiliyetli, istenilen ilaç konsantrasyonunu uzun süreli sağlayan mikrokürelerdir [39].

Radyoaktif mikroküreler

Çevre dokulara zarar vermeden hedef bölgeye giden arterlere enjekte edilen alfa, beta ve gama yayıcılar gibi yüksek doz radyasyon taşıyan radyoaktif mikrokürelerdir [40].

Polimerik mikroküreler

Doğal polimerik mikroküreler

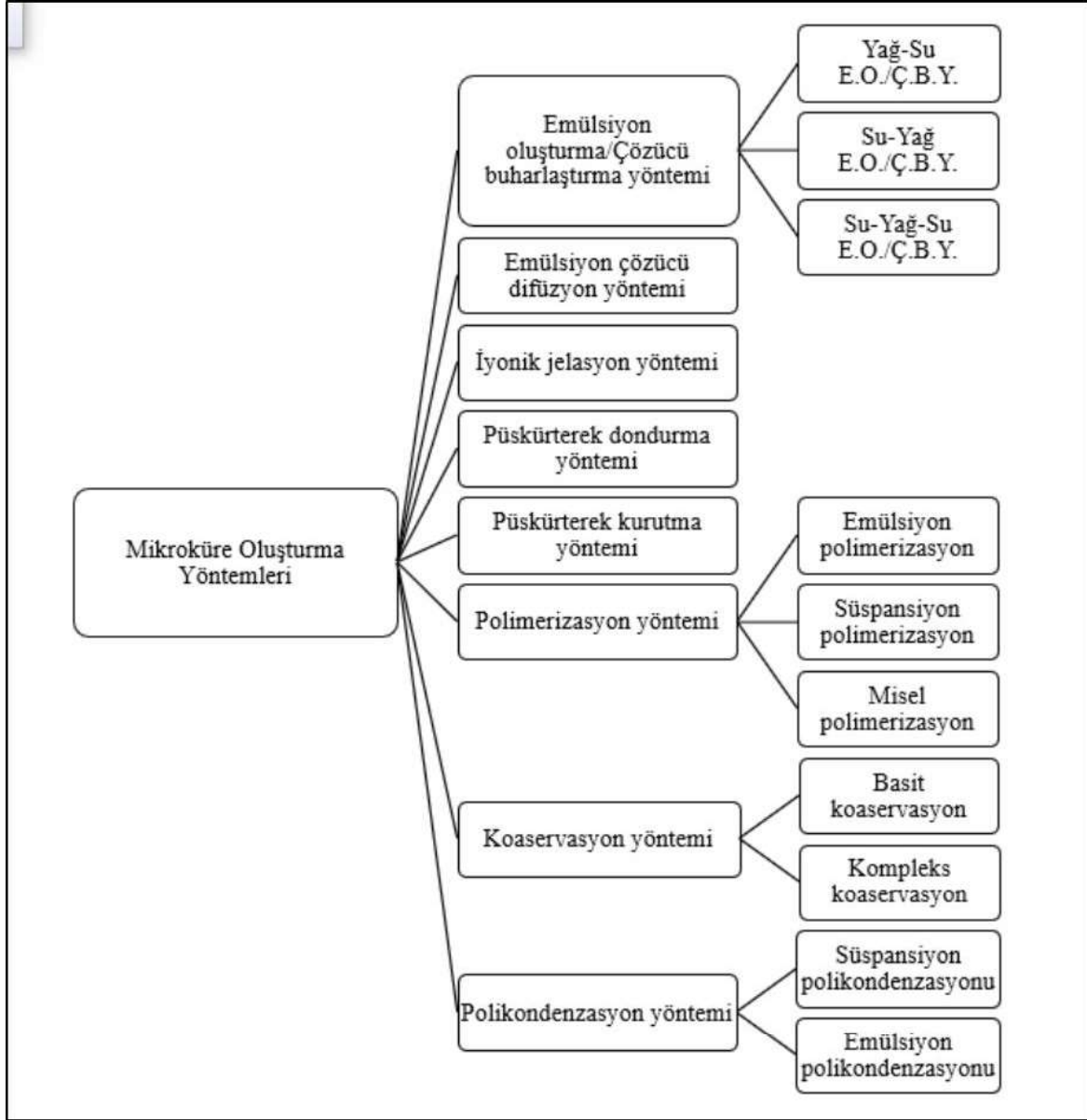
Nişasta vb. biyobozunur, biyoyumlu ve biyoadhezif doğada bulunan doğal polimerlerin kullanıldığı mikrokürelerdir. Yüksek şişme özelliği gösterirler, böylece mukoza ile temas ettiğinde kalma süresi uzayarak jelleşme görülür. Etken madde salım hızı ve kapsamı polimer konsantrasyonu ve salım paterni ile kontrol edilir. Etken madde salımını kontrol etmek zor olsa da mikroküre bazlı uygulamalarda geniş uygulama alanı sağlar. Doğal polimerler; albümin, jelatin, kollajen vb. polimerin içinde bulunduğu proteinler, agaroz, aljinat, nişasta vb. polimerin içinde bulunduğu karbonhidratlar ve polidekstran, polinişasta vb. polimerlerin içinde bulunduğu kimyasal olarak modifiye edilmiş karbonhidratlar olarak 3 grupta incelenebilir [36].

Sentetik polimerik mikroküreler

Biyoyumlu ve güvenli olmaları nedeniyle sentetik polimerler şişmeye yardımcı ajanlar, dolgu maddesi, embolik partiküller ve ilaç taşıyıcı araçlar olarak klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Temel dezavantajları hedef bölgeden uzaklaşma potansiyelleri, emboli ve organ hasarı oluşturma riskleridir. Sentetik polimerler laktitler, glikolitler ve onların kopolimerlerini, poli alkil siyano akrilatlar, polianhidritler vb. birçok polimerin içinde yer aldığı biyobozunur/biyoyumlu ve akrolein, epoksi polimerler, glisidil metakrilat vb. polimerlerin gruplandırıldığı biyobozunur/biyoyumlu olmayanlar olarak iki grupta toplanır [36].

2.2.2. Mikroküre oluşturma yöntemleri

Mikrokürelerin etken maddeyi hapsedebilme ve onun kontrollü salımı sağlamasındaki başarısında kullanılan polimerler ve hangi metodun kullanıldığı büyük önem taşımaktadır. Mikroküreler birçok farklı yöntemle oluşturulabilir (Şekil 2.8.) [41, 42-45].



Şekil 2.8. Mikroküre oluşturma yöntemleri

2.2.3. Mikrokürelerin avantajları ve dezavantajları

Mikrokürelerin avantajlarını şöyle sıralayabiliriz [35]:

- Zayıf çözünürlüklü maddelerin çözünürlüğünü güçlendirmek için partikül boyutu azaltılabilir.
- Sürekli ve uzun süreli terapötik etki sağlar.
- Kanda uygun dozun sürekliliğini sağlar.
- Doz ve toksisitesi azdır.

- Bozunma ve etken madde salımında kontrol edilebilir değişiklikler sağlar.
- Küresel şekli ve küçük boyutlarıyla enjekte edilebilirlik sağlar.
- Fotolitik ve enzimatik yıkım gibi çevresel etmenlerden taşınan etken madde korunur.
- Tedavide kullanılan ilacın alım sıklığını azaltarak tedavi sürecine uyumu kolaylaştırır.
- Tedavide kullanılan ilaçtan en iyi yararlanımı kazandırır ve yan etkilerin insidansını ve yoğunluğunu azaltır.
- Mikrokürelerin morfolojisi ilaç salım ve degradasyonunda kontrol edilebilir bir çeşitlilik sağlar.
- Bazı etken maddelerin acı veya istenmeyen tatlarını katı polimer bir yüzey içine hapsedilmiş sıvı form şeklinde oluşturulan halleriyle maskeler.
- Bazı etken maddelerin sahip olduğu tahriş edici etkiden gastrointestinal sistemi korur.
- Biyobozunur mikroküreler, daha büyük polimer implantlara göre, implantasyon ve implantı sökme aşamaları gibi cerrahi prosedürler gerektirmediğinden daha avantajlıdır.

Mikrokürelerin dezavantajlarını şöyle sıralayabiliriz [35]:

- Standart formülasyonlardan, kontrollü salım sistemlerinin hazırlanma süreçleri ve materyaller daha yüksek maliyetli.
- Polimer matris çevresel faktörlerden etkilenir.
- Polimere plastikleştiriciler, stabilizörler, dolgu maddeleri vb. eklenir.
- Tekrarlanabilirlik azdır.
- Sıcaklık, pH, çözücü eklenmesi, buharlaştırma/çöktürme gibi değişen proses koşulları enkapsüle edilen çekirdekteki maddenin stabilitesini etkileyebilir.
- Isı, hidroliz, oksidasyon, solar radyasyon ve biyolojik ajanlara cevap olarak üretilen polimer matrisin degradasyon ürünleri çevreyi etkiler.

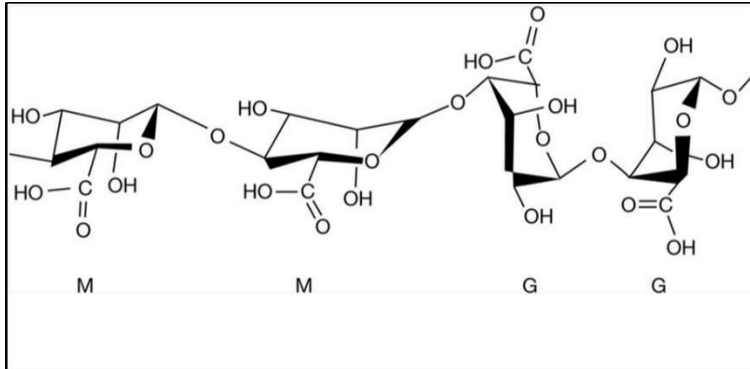
2.2.4. Mikrokürelerde sodyum aljinatın kullanılması

Kimyasal olarak aljinatlar 1,4- β -d-mannuronik ve α -l-glukuronik asitlerden oluşan doğrusal bir polisakkarittir (Şekil 2.9.) [46]. Molekül formülü $(C_6H_7NaO_6)_n$ veya $C_6H_9NaO_7$ şeklindedir. Moleküler ağırlığı 216,121 g/mol'dür. Sodyum Aljinat (NaAlg), şelatlama aktivitesi ile birlikte kahverengi alglerin hücre duvarlarından özütlenen zank ve aljinik asidin sodyum tuzu formudur. Şekil 2.9.'da NaAlg eldesinde kullanılan bir kahverengi alg

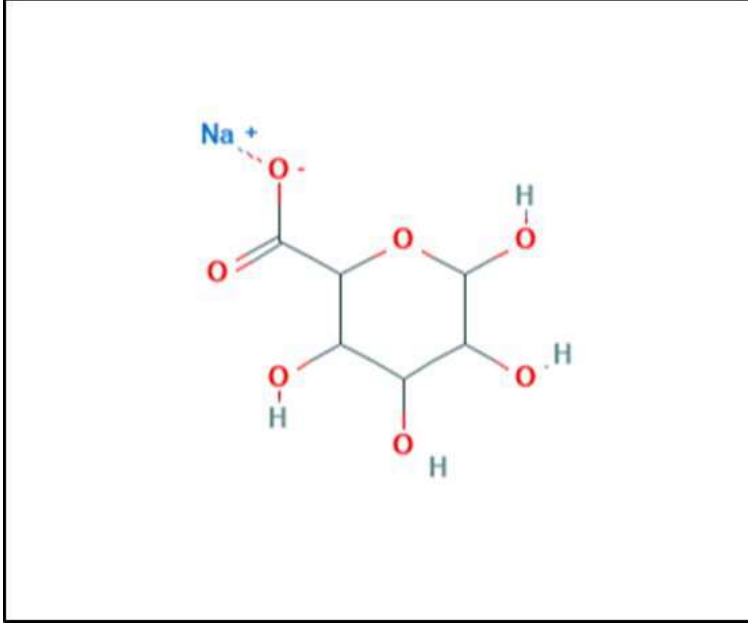
Laminaria digitata gösterilmiştir [47]. Şekil 2.10.'da NaAlg'ın polimer yapısı, Şekil 2.11.'de moleküler yapısı gösterilmiştir [46, 48]. NaAlg'ın CaCl₂ ile oluşturduğu yumurtakutusu (egg-box model) modeli Şekil 2.12.'de gösterilmiştir [49].



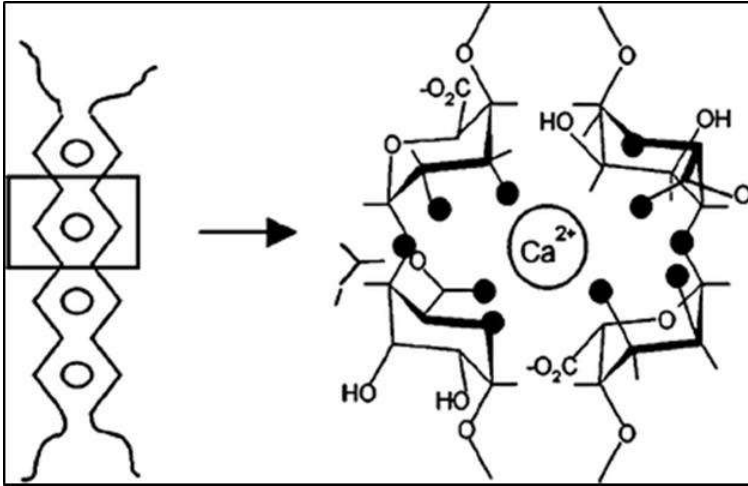
Şekil 2.9. *Laminaria digitata* [47]



Şekil 2.10. NaAlg ile oluşturulan polimerin yapısı M (mannuronik asit), G (glukuronik asit) [46]



Şekil 2.11. NaAlg'ın moleküler yapısı [48]



Şekil 2.12. Kalsiyum ve aljinatın oluşturduğu etkileşimin şematik gösterimi [49]

Aljinat, biyoyumluluk ve jelleşme kolaylığı da dahil olmak üzere uygun özellikleri nedeniyle biyomedikal bilim ve mühendislikte çok tercih edilen bir biyomateryaldir. Yara iyileşmesi, ilaç verme ve doku mühendisliği uygulamalarında dokulardaki hücre dışı matrislere yapısal benzerliğe sahiptir ve çeşitli fonksiyonlar kazandırmak amacı ile manipüle edilebilir yapıda olduklarından özellikle çekici olmuştur [8].

NaAlg, transdermal ve transmukozal ilaç taşıma sistemlerinde viskozite artışı için çok yönlü fonksiyonel biyomateryal, stabilizör, matrisleme ajanı, enkapsülasyon polimeri, biyoadhezif ve film yapıcı materyal olarak kullanılmaktadır [50].

NaAlg'in çözünürlüğü soğuk suda yavaşça gerçekleşir, viskoz bir form, koloidal bir çözelti oluşturur. Alkolde ve ağırlıkça %30'undan daha fazla alkol bileşimi içeren hidroalkolik solüsyonlarda çözünmez. Diğer organik çözücülerde de çözünmez. Kloroform, eter ve pH 3'ün altındaki asit çözeltilerin %1'lik distile su solüsyonu yaklaşık 7.2 pH değerine sahiptir [51].

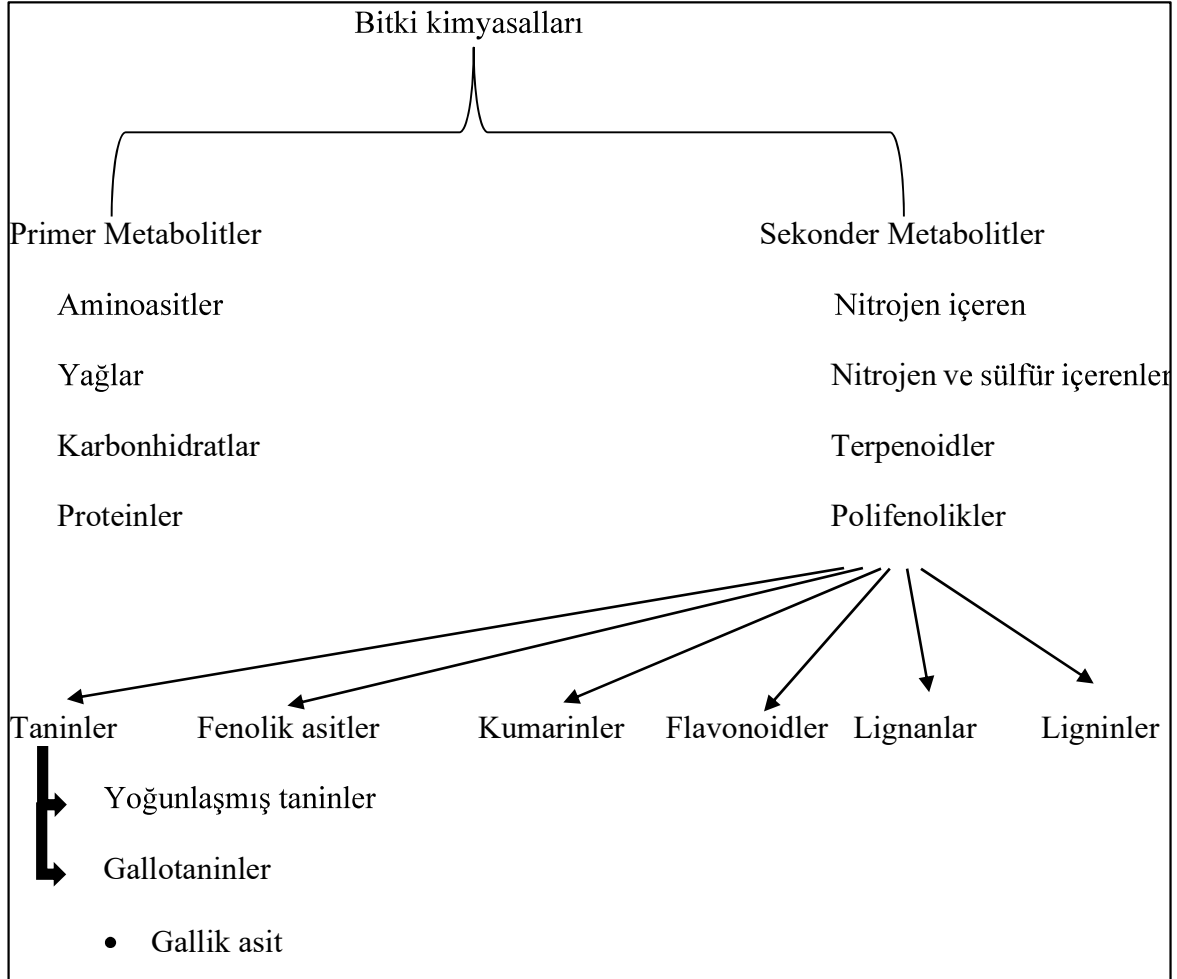
Aljinatlara satın alınabilir yiyecekler olarak, ultra saf olarak veya araştırmalarda kullanılmak üzere farklı şekillerde ulaşılabilir. İlaç taşıyıcı uygulamalarda en önemli faktör biyoyumluluk ve malzemenin immünojenliğidir. Aljinat immünojenitesi için iki ana katkı sağlayıcı aljinatlarda bulunan mitojenik kontaminantlar ve kimyasal kompozisyonudur. Bunlar sitokin salınımı ve enflamatuar etki gibi yan etkilerin tek sorumlusudur. Sitokin üretimini aktive eden aljinatın glukuronik asit yönünden zengin olan formlarıdır. Aljinatların kan ile etkileşimde bulunduğu hemolizi azalttığı ve minimum sitotoksik etki gösterdiği bilinir. Aljinik asitin miktarı ve saflığı onun biyoyumluluğunu ve gücünü belirler. Fakat glukuronik asidin biyoyumluluğu tartışma konusudur [51, 52].

2.3. Polifenoller ve Gallik Asit

2.3.1 Polifenoller

Polifenoller birden fazla fenol grubu taşıyan bileşiklerdir. Polifenoller, bitki kimyasallarının sekonder metabolitlerinden olup en büyük grubudur ve birçoğu bitki bazlı gıdalarda bulunur (Şekil 2.13.). Diyet polifenolleri, insan sağlığındaki rolleri nedeniyle beslenme uzmanları, gıda bilimcileri ve tüketiciler arasında büyük ilgi görmüştür. Son yıllarda yapılan araştırmalar polifenollerin dejeneratif hastalıkların, özellikle kanserler, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde rolünü kuvvetle desteklemektedir [53, 54]. Polifenoller, aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif strese karşı bir savunma olarak antioksidan vitaminlerin ve enzimlerin fonksiyonlarını tamamlayan ve işlevlerine katkıda bulunan güçlü antioksidanlardır. Polifenollerin antioksidan aktivitesinin kanıtlarının çoğu *in vitro* çalışmalara dayanmasına rağmen, artan kanıtlar, *in vivo* antioksidan fonksiyonlarının ötesinde bir şekilde etki edebildiklerini göstermektedir. Meyveler, sebzeler, kepekli tahıllar ve çay, çikolata ve şarap gibi diğer yiyecek ve içecek türleri, polifenollerin zengin kaynaklarıdır. Polifenollerin bitkilerde çeşitliliği ve geniş

dağılımı, doğal olarak oluşan bu bileşiklerin sınıflandırılmasında farklılıklara yol açmıştır [55].



Şekil 2.13. Bitki kimyasallarında GA'nın yeri

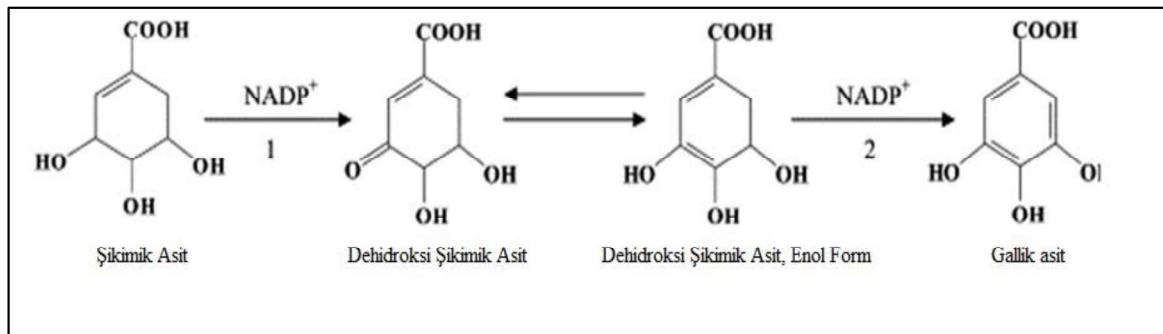
Polifenollerin biyosentezi, GA gibi fenolik asitlerin şikimat yolağı metabolitleri olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.14.). Flavonoidler gibi kompleks polifenollerin biyosentezi, plastid ve mitokondriyal türevi ara maddeler yoluyla birincil metabolizmaya bağlıdır [55].

Polifenoller ısı, ışık ve oksijenden etkilenebilir [55].

Polifenoller, bitkilerin kendilerini diğer organizmalardan korumak için ürettikleri ikincil metabolitlerdir. Diyet polifenollerinin insan sağlığında önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Polifenoller bakımından zengin meyve, sebze ve tam tahıl alımı, kanser, kardiyovasküler hastalık, kronik enflamasyon ve birçok dejeneratif hastalık gibi birçok kronik hastalığın riskini düşürmüştür [53, 54]. Son çalışmalar, bu hastalıkların çoğunun reaktif oksijen ve azot

türlerinden oksidatif stres ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Fitokimyasallar, özellikle polifenoller, C vitaminden ziyade meyvelerin toplam antioksidan aktivitelerine en çok katkı yapan faktördür [56]. Polifenollerin, bir elektron veya hidrojen atomu bağışlayarak serbest radikalleri nötralize edebilen güçlü antioksidanlar olduğu bulunmuştur. Polifenoller serbest radikallerin oluşumunu baskılar, böylece aktif türlerin ve serbest radikallerin öncüllerinin oluşumunu engelleyerek veya etkisizleştirerek oksidasyon oranını azaltır. Daha sık olarak, bunlar lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarının doğrudan zincir temizleyicileri (zincir kırıcılar) görevi görür. Zincir kırıcılar serbest radikallere bir elektron bağışlayarak, radikalleri nötralize eder ve kendilerini stabil (daha az reaktif) radikal haline getirir, böylece zincir reaksiyonlarını durdurur [57-59]. Radikal temizlemeye ek olarak, polifenoller ayrıca metal şelatörler olarak da bilinir. Fe^{2+} gibi geçiş metallerinin şelatlanması doğrudan Fenton reaksiyon hızını azaltabilir, böylece yüksek reaktif hidroksil radikallerinin neden olduğu oksidasyonu önleyebilir [58, 60]. Polifenoller tek başlarına etki etmez. Polifenollerin aslında bir ko-antioksidan görevi gördüğü ve esansiyel vitaminlerin yenilenmesinde rol oynadığı bulunmuştur [61]. Polifenoller, sırasıyla hidroperoksitleri, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonlarını parçalayan ve ksantin oksidaz gibi enzimlerin ekspresyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimleri indükleyebilir [62].

Flavonoidler gibi polifenoller gastrointestinal kanaldan emilebilse de insan dokularındaki plazma konsantrasyonları kısmen hızlı metabolik aktivite nedeniyle düşüktür, genellikle 1 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 'den azdır [55, 63-66].

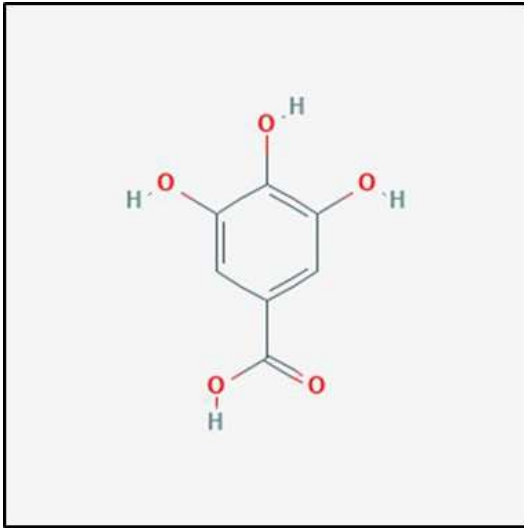


Şekil 2.14. GA'nın bitkilerde biyosentezi [67]

2.3.2. Gallik asit

Bir polifenol olan gallik asit (GA; 3,4,5-trihydroxyl-benzoic acid), özellikle çilek, üzüm gibi kırmızı meyveler, muz, ananas, limon, elma kabuğu, güvercin ağacı gibi yiyecekler ile çikolata, kırmızı ve beyaz şarap gibi işlenmiş yiyeceklerde bulunmaktadır [9-11].

Gallik asit, 3,4 ve 5 pozisyonlarında hidroksil grubu bağlı olan bir trihidroksi benzoik asittir. Damarları büzücü bir etki gösteren, siklooksijenaz-2 inhibitörü, bir bitki metaboliti, antioksidan, neoplastik ajan, insan ksenobiyotik metaboliti, araşidonat 15-lipoksijenaz inhibitörü ve apoptoz indükleyicisidir. Gallatin bir konjuge asidir. Molekül formülü $C_7H_6O_5$ veya $C_6H_2(OH)_3COOH$ şeklindedir. Molekül ağırlığı 170,12 g/mol. Yapısı Şekil 2.15.'te gösterilmiştir [68].



Şekil 2.15. Gallik asit molekül yapısı

GA tannik asitlerin hidroliziyle elde edilebilir. Farklı yan gruplarla farklı farmakolojik, farmakokinetik, farmakodinamik etkilere sahip olabilir. GA'nın ester türevleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir [9, 69].

Çizelge 2.2. Gallik asit ester türevleri

Gallatlar	(-R)
Gallik asit	(-H)
Metil	(-CH ₃)
Etil	(-(CH ₂)-CH ₃)
Propil	(-(CH ₂) ₂ -CH ₃)
Bütil	(-(CH ₂) ₃ -CH ₃)
Pentil	(-(CH ₂) ₄ -CH ₃)
Hekzil	(-(CH ₂) ₅ -CH ₃)
Heptil	(-(CH ₂) ₆ -CH ₃)
Oktil	(-(CH ₂) ₇ -CH ₃)
Desil	(-(CH ₂) ₉ -CH ₃)
Undesil	(-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃)
Dodesil	(-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃)
Tetradesil	(-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃)
Hekzadesil	(-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃)
Oktadesil	(-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃)

Çok etkili bir antioksidan olan GA, çeşitli kanser türlerinde önemli bir sitotoksik etki gösterir. GA normal hücelere karşı az sitotoksik etki göstermesi ve kanser hücelerine karşı gösterdiği yüksek toksik etki nedeniyle önemli bir doğal biyoaktif gıda bileşenidir [9, 12-15, 70].

GA'nın lösemi, prostat kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, rahim ağzı kanseri ve özofagus kanseri [9, 10, 15-17], melanoma kanseri [9], pankreas kanseri [20], ağız içi tümörleri [13] ve beyin tümörü [14, 18] hüceleri üzerinde olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle kanser tedavilerinde odak noktası haline gelmiştir.

GA'nın bazı kanser türlerindeki etkileri Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir [11, 71]. GA kanser hüceleri üzerinde antikanser aktivite göstermesiyle birlikte çok iyi bir radikal süpürücü, kanser gelişimini engelleyici ve kötü huylu kanser hücelerine dönüşümü önleyici aktiviteleri de vardır [15]. GA antikanser özelliğine ek olarak metal varlığında pro-oksidan özelliği de taşımaktadır [11]. GA-apoptoz ilişkisi üç farklı nedene bağlanmıştır; intraselüler

Çizelge 2.3. Gallik asidin bazı kanser türleri üzerindeki etkileri

Kanser Hücre Hattı	Hücre Tipi	Gallik Asidin Etkisi
KATO III	Mide kanseri	Apoptoz
COLO 205	Kolon adenokarsinom	Apoptoz
3T3L1	Adiposit	Apoptoz
DU145	Prostat kanseri	Apoptoz
22Rv1	Prostat kanseri	Apoptoz
Calu-6	Akciğer kanseri	Apoptoz
A459	Akciğer kanseri	Apoptoz
HeLa	Rahim ağzı kanseri	Apoptoz
U87	Glioma hücreleri	Anti-anjiyojenik
U251n	Glioma hücreleri	Anti-anjiyojenik
HL-60	Lösemi	Anti-proliferatif
HT-29	Kolon kanseri	Apoptoz
Caco-2	Kolon adenokarsinom	Apoptoz

Literatürde GA'nın anti-kanser özelliğine ek olarak;

- Antioksidan [9, 10, 13, 18, 72],
- Antienflamatuar [18],
- Antidiyabetik [18],
- Antianjiyojenik, [12]
- Antimelanogenik [12],
- Antibakteriyel [73],
- Antiviral [73, 9],
- Antifungal [9],
- Antialerjik,
- Antiülser [9, 18],
- Antimutajenik [11] etkileri ve
- Yara iyileşmesinde olumlu etkileri [19] olduğu da gösterilmiştir.

2.3.3. Gallik asit taşıyan kontrollü salım sistemleri

GA'nın bilinen çok önemli biyoaktif özelliklerini korumak, bunlara ek olarak düşük yarı-ömür ve vücuttan hızlıca atılma nedenlerinden dolayı bu aktif özelliklerden yararlanabilmek için vücuda sık uygulanma gereksiniminden dolayı biyoyararlanımı artırmak için birçok çalışmada kontrollü salım sistemlerinin gelecek vadede bir sistem olduğu vurgulanmıştır [74].

Singh ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında GA, çözücü buharlaştırma yöntemiyle fosfotidilkolin ile enkapsüle edilmiştir. Oluşturulan mikrokürelerin karakterizasyonunda FTIR, DSC, X-RPD, SEM analizleri kullanılmıştır. GA'nın enkapsülasyon verimi yaklaşık %89,1 olarak tespit edilmiş. Oluşturulan kompleksin GA'dan biyoyararlanımı artırmak için önerilebileceği, yalnız *in vivo* çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır [74].

Medina-Torres ve arkadaşları 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında GA'nın sprey kurutma yöntemi kullanarak enkapsülasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enkapsülasyonda polimer olarak *Opuntia ficus indica* bitkisinden elde ettikleri nopal müsilaj kullanılmıştır. Karakterizasyonunda PSD (Parçacık büyüklüğü dağılımları), DSC, SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Enkapsüle edilen GA'nın %65'ini 2,47 günde salan bir sistem geliştirilmiştir [75].

Da Rosa ve arkadaşlarının 2013'de yayınladıkları çalışmalarında GA'nın kitosan, beta-siklodekstrin ve ksantan olmak üzere 3 farklı polimerle mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsülasyonda liyofilizasyon metodu kullanılmıştır. Oluşturulan mikrokürelerin karakterizasyonunda FTIR, SEM, DSC, TGA (Termogravimetrik analiz) kullanılmıştır. Oluşturulan enkapsülasyon sonucunda GA'nın antioksidan aktivite kaybı göstermediği ve üç farklı polimerden en verimli mikroküre eldesinin kitosan ile sağlandığı ifade edilmiştir [76].

Neo ve arkadaşlarının 2013'te yayınladıkları çalışmalarında GA elektrospin yöntemi aracılığıyla doğal bir polimer olan zein proteiniyle enkapsüle edilmiştir. Oluşturulan kompleks liflerin karakterizasyonu XRD, DSC, ATR-FTIR, TGA ile gerçekleştirilmiştir. GA'nın antioksidan özelliğinin tayininde DPPH metodu kullanılmıştır. Sonuç olarak gıda

endüstrisinde kullanım alanı bulabilen kapsüllenmiş fonksiyonel bileşen oluşturduklarını bildirmişlerdir [77].

Wary ve arkadaşlarının 2014'te yayınladıkları çalışmalarında GA'nın kitosan ile mikroküreleri oluşturulmuş ve onlar kolajen bir matrisle birleştirilerek kronik yaralar için bir kontrollü salım sistemi elde edilmesi amaçlanmıştır. Oluşturulan mikrokürelerin karakterizasyonunda DSC ve FTIR analizleri kullanılmış, hemolitik analiz, MTT ile sitotoksik analiz, Fenton ajanıyla antioksidan analiz, disk difüzyon metoduyla antibakteriyel analiz gerçekleştirilmiş, sonuç olarak kitosan-GA kolajen matrisin biyofiziksel ve biyokimyasal özellikleriyle birlikte incelediklerinde yara iyileşmelerinde kullanılması umut verici biyoözelliklere sahip olduğu ifade edilmiş [78].

Dorniani ve arkadaşlarının 2016'da yayınladıkları çalışmalarında kanser terapileri için GA taşıyan grafen oksit nanotaşıyıcılar geliştirilmiş, karakterizasyonunda XRD, FTIR, Raman Spektroskopisi, HRTEM (Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu) analizleri kullanılmıştır. Oluşturdukları nanokompozit normal fibroblast hücreleri ile biyouyumlu olduğu ve karaciğer kanseri (HepG2) hücreleri üzerinde antikanser aktivite gösterdiği ifade edilmektedir [79].

Aytaç ve arkadaşları 2016'da gıda ürünlerinin raf ömrünü artırmak için bir gıda ambalaj malzemesi olarak ve genel gıda kalitesini arttırmak amacıyla GA/CD (Gallik asit/Siklodekstrin) taşıyan nanofiberler hazırlamışlardır. Karakterizasyonunda XRD, NMR (Nükleer manyetik rezonans), SEM analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada GA'nın salımını ve antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Nanofiberler elektrospin metoduyla hazırlanmış antioksidan aktivite DPPH metoduyla ölçülmüştür. Araştırma bulgularına göre bu kompozit GA'nın antioksidan aktivitesi korunmada başarılı olmuş, GA'nın nanofiber halinin GA'nın serbest hali kadar radikal süpürmede etkili olduğu ifade edilmiştir [80].

Shrivastava ve arkadaşlarının 2016'da yayınladıkları çalışmalarında çözücü buharlaştırma metodu kullanarak Eudragit polimeriyle oluşturulmuş GA taşıyan mikroküreler oluşturulmuştur. Mikrokürelerin karakterizasyonunda FTIR ve SEM analizleri kullanılmıştır. Mikroküre boyutu 31,65-40,15 µm arasında değişen, tutuklama verimi %55,96-76,54 arasında değişen mikroküreler elde edilmiştir [81].

Alonso ve arkadaşlarının 2016'da yayınladıkları çalışmalarında bir kozmetik kumaş yapımında GA'nın enkapsüle edildiği mikroküreler kullanılmıştır. Bu enkapsülasyonda poly-ε-kaprolakton (PCL) polimeri kullanılmıştır. Mikroküre oluşturulmasında çözücü buharlaştırma metodu (su-yağ-su çift emülsiyon) kullanılmıştır. Ciltte bölgesel uygulamalarda GA'nın antioksidan aktivitesi kullanılması amaçlanmış ve oluşturulan mikrokürelerin gömüldüğü kozmetik kumaş insan gönüllüler üzerinde uygulaması gerçekleştirilmiştir. Sonuçların GA'nın insan stratum corneum tabakasında lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği ifade edilmiştir ve uzun uygulama periyotları ile böyle kumaşların cildin foto koruma kapasitesinin doğal yöntemlerle artırılması sağlanabilir olduğu ifade edilmektedir [82].

Li ve arkadaşlarının 2016'da yayınladıkları çalışmalarında elektrosprey yöntemiyle GA yüklü kalsiyum aljinat boncuklar elde edilmiş. Oluşturulan boncukların boyutları 5 kV'de 1156mm, 7.5 kV'de 400 mm, 10 kV 200 mm olduğu ifade edilmiştir. Boncukların karakterizasyonunda DSC, ATR-FTIR analizleri kullanılmış, oluşturulan kürelerin mide ortamında bağırsaktan daha hızlı salım yaptığı ve GA gibi fenolik bileşikler için umut vadeden bir taşıma sistemi olduğu ifade edilmiştir [83].

Rosman ve arkadaşları 2018'de yayınladıkları çalışmalarında GA taşıyan A549 (İnsan akciğer kanser hücre hattı), MCF-7 ve HT-29 kanserlerine karşı manyetik nanokompozitler geliştirmiştir. GA bu çalışmada polietilen glikol ile kaplanmış ardından demir oksit ile bağlanmıştır. Oluşturulan manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonunda XRD, DLS (Dinamik ışık saçılımı) analizleri gerçekleştirilmiştir. Kanser hücrelerinde sitotoksik etki MTT analiziyle gerçekleştirilmiş. Oluşturulan nanokompozitlerin normal fibroblast hücreleriyle biyouyumlu olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda serbest GA'dan daha iyi antikanser aktivite gösterdikleri bulunmuştur [84].

3. MATERYAL/METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Mikroküre oluşum aşamasında kullanılan NaAlg ve Tween-80 Fluka firmasından; Gallik asit ve CaCl₂ Merck'den; parafin Aklar Kimya firmasından; Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, hekzan ve propanol Carlo Erba Reagent firmasından temin edilmiştir. Etanol ISOLAB Chemicals firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Cihazlar

Rigol Ultra 3600 UV/Visible spektrofotometre cihazı kalibrasyon çalışmalarında, verim analizi ve salım çalışmalarında miktar belirlemede ve antioksidan analizinde DPPH radikali süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılmıştır.

Medline BS-21 marka çalkalamalı su banyosu cihazı, tutuklama verimi ve salım çalışmalarında gerekli ortamı sağlamak için kullanılmıştır.

Etüv olarak Binder redLine cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz oluşturulan mikrokürelerin kuruması için gereken ortamı sağlamak için kullanılmıştır.

Manyetik karıştırıcı olarak Biosan Magnetic Stirrer MSH-300 cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz mikrokürelerin oluşturulması aşamasında polimer ve GA içeren çözeltilerin karıştırılmasında, tüm deney aşamalarında gereken çözeltilerin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Hana pH211 microprocessor pH meter cihazı salım çalışmaları sırasında gereken pH'nın ayarlanması aşamasında kullanılmıştır.

XRD analizleriyle mikrokürelerin ve GA'nın X- Işını kırınımı verilerini elde etmek için ODTÜ Merkez Laboratuvarından Rigaku Ultima-IV X Işını Kırınımı ve Gazi Üniversitesi

Fotonik Araştırma ve Uygulama Merkezi XRD Laboratuvarından GNR APD 2000 Pro XRD cihazları kullanılarak hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

DSC analizleri için ODTÜ Merkez Laboratuvarından Perkin Elmer Diamond Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Cihazı kullanılarak hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

SEM analizleri ODTÜ Merkez Laboratuvarından Quanta 400F Field Emission SEM Cihazı kullanılarak hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizleri Gazi Üniuersitesi Fotonik Araştırma ve Uygulama Merkezinden Bruker Vertex 80V Cihaz kullanılarak hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

Mikroküre hazırlama çalışmalarında su-yağ-su emülsiyon çapraz bağlama yöntemi ile sıvıda olgunlaştırma metodu kullanılarak boş ve GA/NaAlg oranı 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 olmak üzere 4 farklı oranda mikroküreler oluşturulmuştur. Oluşturulan farklı orandaki mikroküreler 15, 30 ve 45 dk. olmak üzere 3 farklı çapraz bağlayıcı süresine maruz bırakılmıştır. Mikrokürelerin küre verimi ve tutuklama verimi analizler gerçekleştirilmiştir. Mikrokürelerin denge şişme değerleri ve çapraz bağ yoğunluğu hesaplanmıştır, salım profilleri incelenmiştir.

Mikrokürelerin karakterizasyonunda DSC, XRD, FTIR, SEM analizleri kullanılmıştır. Enkapsüle edilen GA'nın biyoaktif özelliklerinden antioksidan aktivitesi için DPPH, antikanser aktivitesi için MTT analizi yapılmıştır.

3.2.1. Kalibrasyon alışmaları

Bu alışmada GA'nın miktar tayini için öncelikle spektrofotometre cihazında 200-400 nm dalga boyları arasında tarama yapılmıştır. Daha sonra belirlenen en yüksek absorbansın görüldüğü dalga boyu baz alınarak 0,25-16 mg/L GA solüsyonlarının absorbansları ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

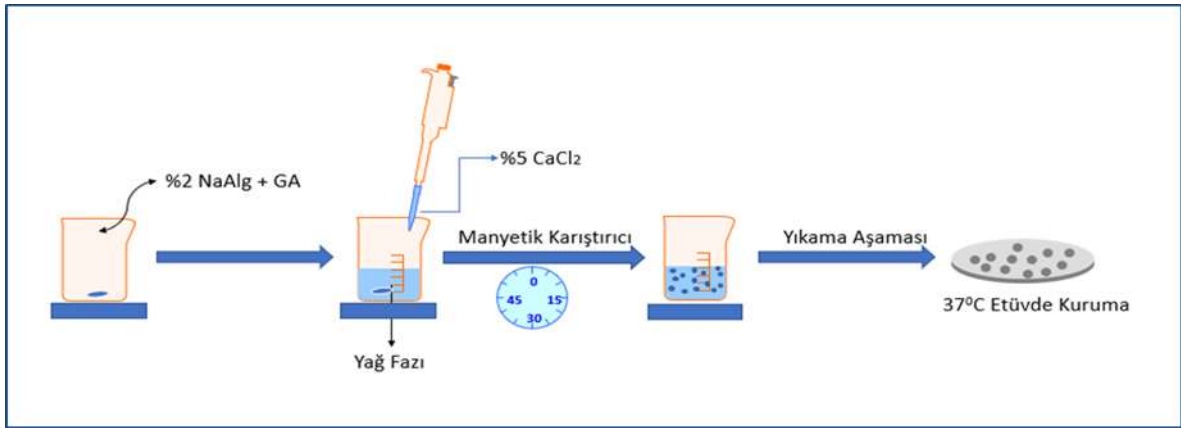
3.2.2. Mikrokürelerin hazırlanması

Mikroenkapsülasyonda kullanılmak üzere doğal bir polimer olan NaAlg'ın %2'lik distile su ile hazırlanmış solüsyonu oluşturulmuştur. 2 gr NaAlg 100 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Mikrokürelerin çapraz bağlanmasında kullanılmak üzere CaCl_2 'nin distile su ile hazırlanmış %5'lik solüsyonu oluşturulmuştur. 5 g CaCl_2 100 mL distile su içerisinde tam olarak çözünebilmesi için manyetik karıştırıcıya bırakılmıştır.

10 mL NaAlg (%2) solüsyonu içine Çizelge 3.1.'de miktarları verilmiş olan oranlarda GA eklenmiştir ve karışım homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda yaklaşık 30 dk. karıştırılmıştır. Karışım üzerine 30 mL parafin ve 5 damla Tween 80 damlatılmıştır. Yaklaşık 15 dk. manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışımın üzerine çapraz bağlayıcı olarak 10 mL CaCl_2 (%5) çözeltisi eklenmiştir.

Farklı çapraz bağlayıcı sürelerine maruz bırakılan karışım organize kumaş üzerine yayılarak sırasıyla propanol, hekzan ve dH_2O ile yıkanmıştır. Oluşan mikroküreler cam saat üzerine toplanarak 24 sa. 37°C etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Kullanılan mikroküre oluşturma yönteminin aşamalarının şematik gösterimi

24 saat sonra kuruyan mikroküreler cam saatten toplanarak hassas terazi aracılığı ile tartılıp (T) küre verimleri hesaplanmıştır. % Küre verimi (%KV) Eş. 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% KV = \frac{T}{GA+NaAlg} \times 100 \quad (3.1.)$$

T: Sabit tartıma gelen mikroküre ağırlığı

Mikrokürelerin hazırlanma koşulları Çizelge 3.1.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Mikrokürelerin hazırlanma koşulları (GA/NaAlg; A: 1/1, B: 1/2, C:1/4, D:1/8, E: Boş NaAlg küreleri)

Formülasyon No.	GA/NaAlg Oranı (w/w)	GA (mg)	NaAlg (gr)	Çapraz Bağlama Süresi (dk)
A1	1/1	200	200	15
A2	1/1	200	200	30
A3	1/1	200	200	45
B1	1/2	100	200	15
B2	1/2	100	200	30
B3	1/2	100	200	45
C1	1/4	50	200	15
C2	1/4	50	200	30
C3	1/4	50	200	45
D1	1/8	25	200	15
D2	1/8	25	200	30
D3	1/8	25	200	45
E1	NaAlg (Boş küre)	0	200	15
E2	NaAlg (Boş küre)	0	200	30
E3	NaAlg (Boş küre)	0	200	45

3.2.3. Tutuklama verimi çalışmaları

Oluşturulan her mikroküre formu için tutuklama verimi hesaplanmıştır. Tutuklama verimi ölçümleri için oluşturulan mikroküreler 37°C ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda distile su içinde 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 37°C'de salım için çalkalamalı su banyosuna bırakılmıştır. Sonuçlar UV spektrofotometresi kullanılarak 210 nm dalga boyunda

ölçülmüştür. Bu ölçümde elde edilen absorbands karşılığındaki GA miktarı kalibrasyon eğrisinde yerine koyularak deneysel GA miktarı hesaplanmıştır (D). % Tutuklama verimi (%TV) hesaplanırken Eş. 3.2. kullanılmıştır.

$$\% TV = \frac{D}{T} \times 100 \quad (3.2)$$

D: Deneysel GA miktarı

T: Teorikte mikrokürelerde bulunan GA miktarı

3.2.4. Salım çalışmaları

Uygun salım ortamı kan pH değeri için pH: 7.4 ortamı oluşturulmuştur. Kan pH değerine uygun olması için hazırlanan pH 7.4 tamponu için $[HPO_4^-]$: 0,05 M ve $[H_2PO_4]$: 0,0314 M karışım kullanılmıştır.

En yüksek %TV'nin elde edildiği D1 (1/8 GA/NaAlg ve 15 dk. $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmış mikroküreler) ve en yüksek %KV'nin elde edildiği D2 (1/8 GA/NaAlg ve 30 dk. $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmış mikroküreler) formülasyonlu mikrokürelerin kontrollü salımı pH:7.4'de $37^\circ C$ 'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Salım solüsyonundan 5, 10 ve 15 dakika aralıklarla alınan numuneler spektrofotometrik olarak 210 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.2.5. Mikrokürelerin denge su içeriği tayini

D1 (1/8 GA/NaAlg ve 15 dk. $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmış mikroküreler) ve D2 (1/8 GA/NaAlg ve 30 dk. $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmış mikroküreler) formülasyonlu mikrokürelerin denge su içerikleri ölçülmüştür. Oluşturulan mikroküreler $37^\circ C$ sıcaklığa ayarlanmış etüvde 24 sa. kurutulduktan sonra ağırlıkları ölçülmüştür (W_k). Sonrasında bu mikroküreler 24 sa. distile su içinde bekletilip yüzeyindeki tüm su uzaklaştırıldıktan sonra tekrar ağırlığı ölçülerek (W_s) hesaplanmıştır.

$$\% Denge Su İçeriği = \frac{W_s - W_k}{W_k} \times 100 \quad (3.8)$$

Ws: Şişmiş mikrokürelerin ağırlığı

Wk: Kuru mikrokürelerin ağırlığı

3.2.6. Çapraz bağ yoğunluğu hesabı

En verimli mikroküre olarak belirlenmiş D2 (GA/NaAlg: 1/8 ve 30 dk. çapraz bağlanmış mikroküreler) formülasyonlu mikrokürelerin çapraz bağ yoğunluğu hesaplanmıştır. Bu hesapta Flory Rehner eşitliği kullanılmıştır.

$$Px = d \div Mc \quad (3.3)$$

Px: Çapraz bağ yoğunluğu

d: Mikrokürenin yoğunluğu

Mc: Molekül ağırlığı

$$d = \frac{(P2-P0) \div (P1-P0)}{G+P2-P3} \times G \quad (3.4)$$

P0: Boş piknometre ağırlığı

P1: Su dolu piknometre ağırlığı

P2: Aseton dolu piknometrenin ağırlığı

P3: Aseton, mikroküre ve piknometrenin ağırlığı

G: Kuru mikrokürenin ağırlığı

d: Mikrokürenin yoğunluğu

$$Mc = V1 \times P2 \times \frac{[(V2m)^{\frac{1}{3}} - (\frac{V2m}{2})]}{-\ln(1-V2m) + V2m + \chi_{12} \times V2m^2} \quad (3.5)$$

V1: Suyun hacmi

P2: dküre

χ_{12} : Polimerin etkileşim parametresi

V2m: Polimerin denge hacmi kesri

$$V_{2m} = \frac{W_0}{V_{egl} \times P_2} \quad (3.6)$$

W₀: Kuru mikrokürenin ağırlığı

V_{egl}: Denge şişme hacmi

P₂: dküre

V_{2m}: Polimerin denge hacmi kesri

$$V_{egl} = \frac{W_0}{P_2} + \frac{W_s - W_0}{P_1} \quad (3.7)$$

V_{egl}: Denge şişme hacmi

W₀: Kuru mikrokürenin ağırlığı

P₂: dküre

P₁: Çözücünün hacmi (su)

W_s: Şişmiş mikrokürenin ağırlığı

3.2.7. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Etken maddenin termal özelliklerinin analizi için yapılan DSC analizi ısı akış miktarındaki farkı ya da numune ile bir referans arasındaki sıcaklık farkını ölçer. Ölçüm sonuçları endotermik ya da ekzotermik süreçler esnasındaki ısı değişimlerini içeren fiziksel veya kimyasal değişimler hakkında bilgi verir [85, 86]. Bu analiz ile numunelerin camı geçiş sıcaklığı (T_g) belirlenmiştir.

ODTÜ Mer-Lab'da hizmet alımı ile DSC analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

IR ışınlarıyla uyarılan moleküllerdeki titreşimleri ölçen bu FTIR tekniğinde numuneye gönderilen IR ışınımı belirli dalga boylarında emilir ve numunedeki kimyasal bağların uyarılarak titreşmesine neden olur. Her fonksiyonel grubun kendine özgü spektrumu ile molekül hakkında bilgi sahibi olunmaktadır [87, 88].

FTIR analizi Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı ile FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. X-Işını difraktometre (XRD) analizi

XRD analizi 1912 yılında Von Laue tarafından keşfedilmiş ve her materyalin kendine özgü olan X-ışını difraksiyonu ile fiziksel özelliklerinin tayinine dayanır. Bir maddenin toz difraksiyonuyla, hatların konumları (θ , 2θ) ve şiddetlerinden yararlanılarak tanımlanır. Difraksiyon açısı kristallerin düzlemler arasındaki mesafesiyle belirlenir [89].

XRD analizi Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. Taramalı elektron mikroskopi (SEM) analizi

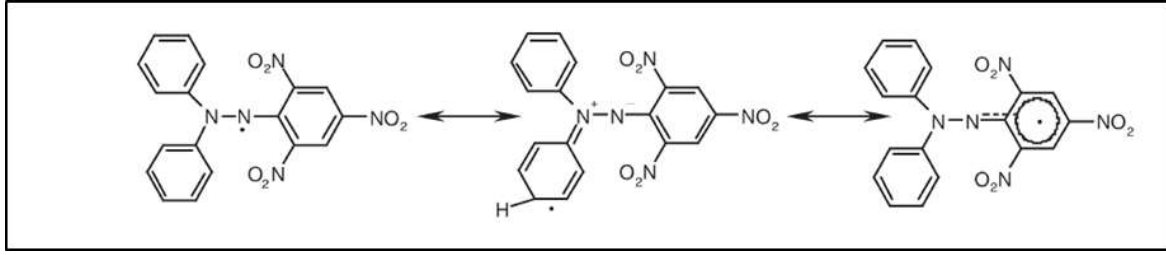
Bir numuneye gönderilen elektronların yüzey ile etkileşiminden sonrası oluşan sinyallerin toplanıp yüksek çözünürlüklü görüntü incelenmesine dayanır. 1930 yılında Manfred Ardenne tarafından keşfedilmiş. [90].

SEM analizi ODTÜ Mer-Lab'da hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

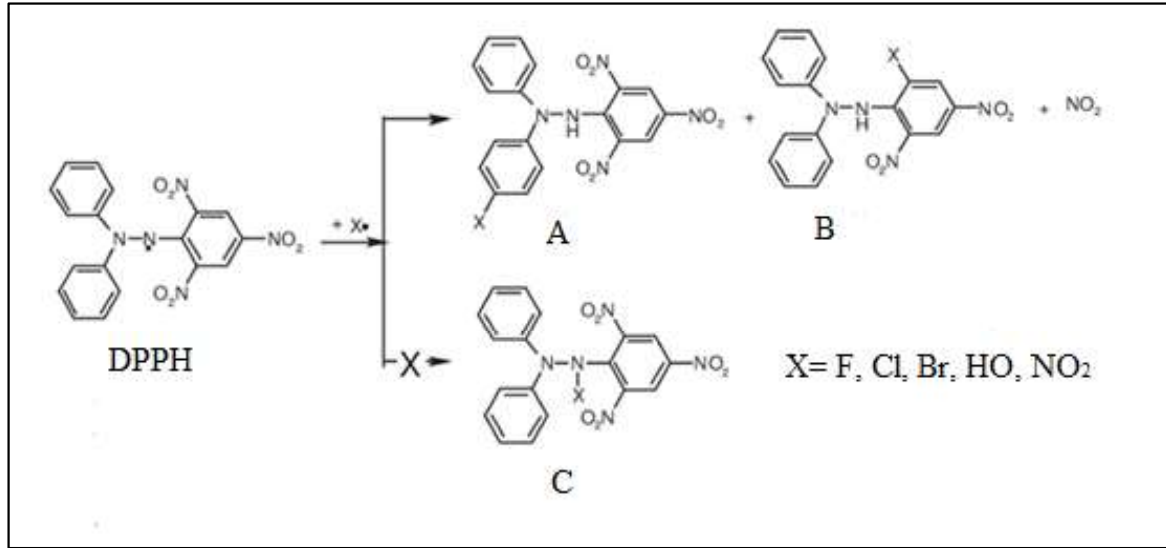
3.2.11. Antioksidan aktivite çalışmaları

Antioksidan aktivite ölçümlerinin amacı mikroenkapsülasyon uygulamasının GA antioksidan aktivitesine etkisinin belirlenmesidir. Bu çalışmada DPPH radikali (Şekil 3.2.)'nin süpürülme aktivitesi ölçülmüştür. Bu süpürme aktivitesi reaksiyonu şematik olarak Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.

Serbest ve kararlı bir radikal olan DPPH radikalini süpürme etkinliğinin ölçümü için D2 formülasyonlu mikroküreler (0,1 g mikroküre, ~5 mg GA) 30dk salım ortamına bırakılmıştır. Salınan solüsyon 517nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Blois'in 1958'de yayınladığı protokol takip edilmiştir [91].



Şekil 3.2. Serbest DPPH radikali [92]



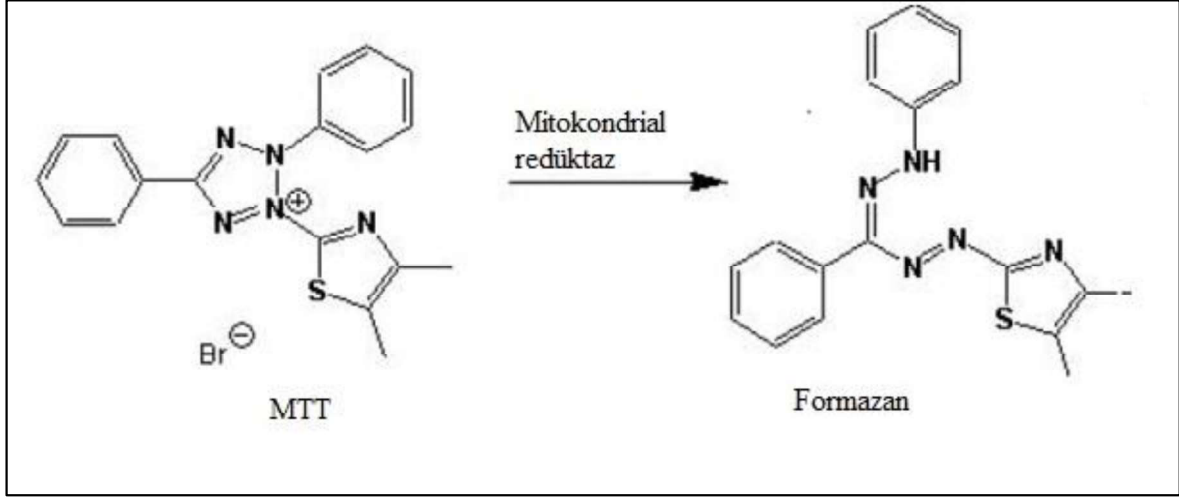
Şekil 3.3. Bir serbest radikal (X) ile DPPH'in reaksiyonu [92]

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali yakalama kapasitesinin ölçülmesi amacıyla 0,05 mg/mL etanolde çözülmüş DPPH reaktifi eklenip hızlıca karıştırılmıştır. 517 nm' de GA standart alınarak spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır [91].

3.2.12. Sitotoksite çalışmaları

GA yüklü mikrokürelerin sitotoksite çalışması MTT analizi Mevkim Makine Kimya Biyoteknoloji Ankara Ofisi'nden hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. MTT analizinin temeli, içerisinde bulunan sarı renkli tetrazolyum tuzlarının canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrojenaz aktivitesiyle indirgenerek mor renkli formazana dönüşmesidir (Şekil 3.4.). Bu dönüşüm neticesinde oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda ölçülebilmektedir. Tetrazolyum halkasının kırılabilmesi yalnızca canlı hücrelerdeki mitokondriyel aktivite ile olması, canlı ve ölü hücreler arasındaki ayrımı sağlamaktadır [93, 94]. GA yüklü mikrokürelerin Caco-2 kolon kanseri üzerine

sitotoksik etkileri MTT ((3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) metodu ile belirlenmiştir.

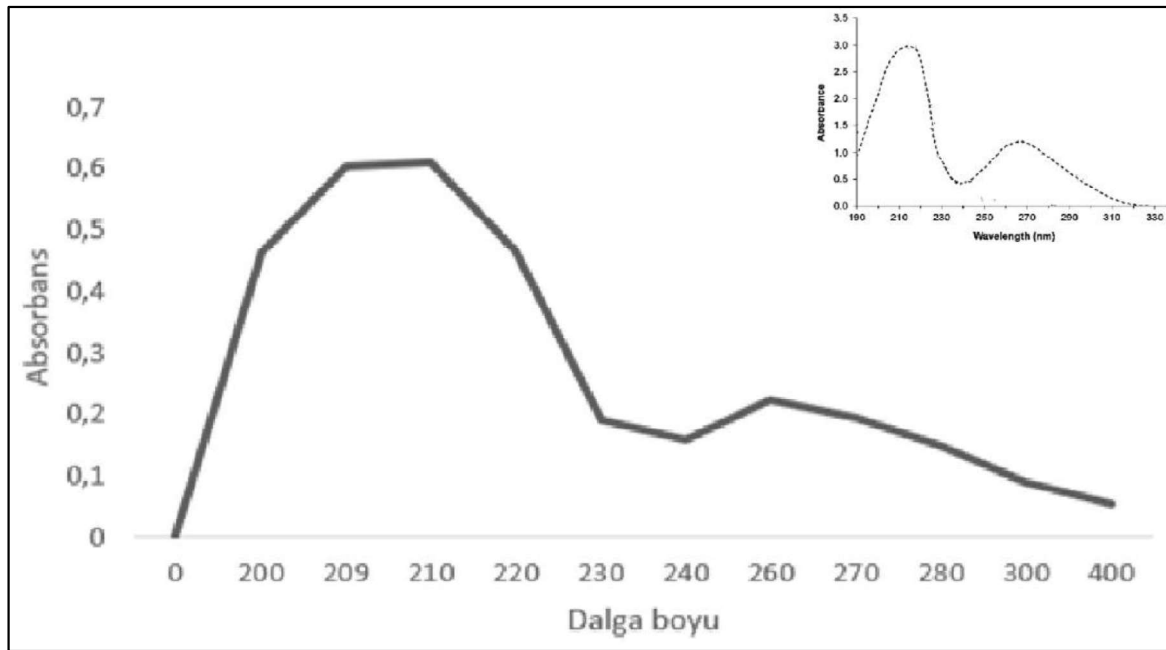


Şekil 3.4. MTT reaksiyonu [94]

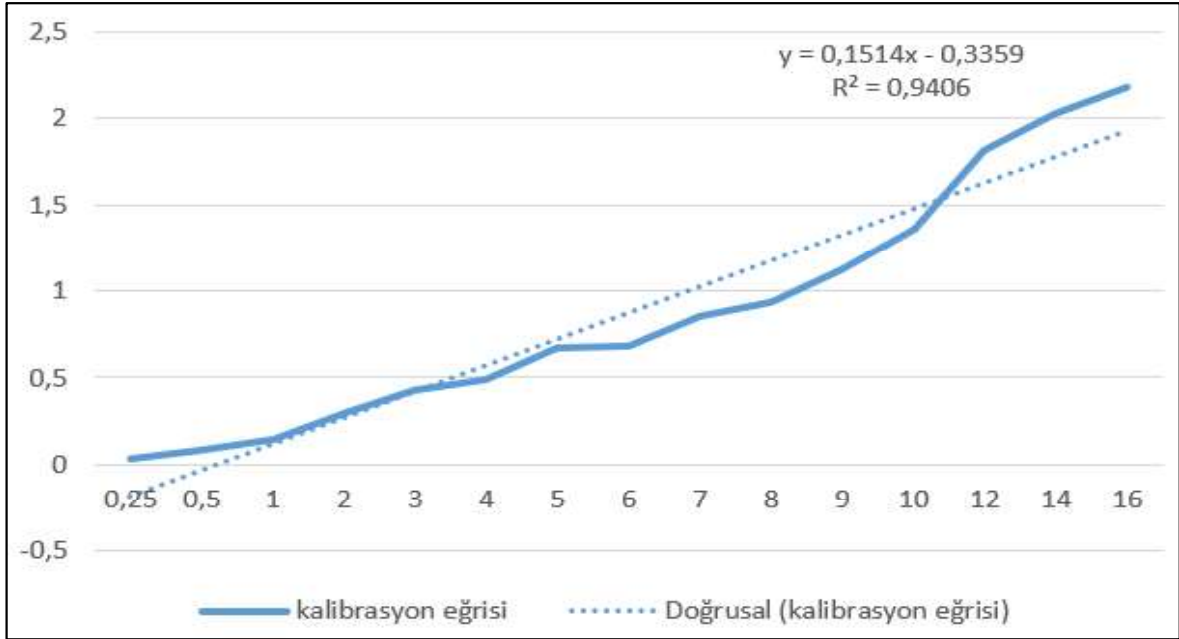
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

GA'nın UV-Vis spektrumunu elde etmek amacıyla 200-400 nm dalga boyu arasında yapılan taraması sonucuyla elde edilen grafik Şekil 4.1.'de gösterilmiştir [95]. Bu dalga boyu taraması ile belirlenen en yüksek absorbansın sağlandığı 210 nm dalga boyuna göre elde edilmiş olan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir [96, 97].



Şekil 4.1. GA UV-Vis spektrumu



Şekil 4.2. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

4.2. Gallik Asit Yüklü Mikrokürelerin Verim Hesabı

%5 oranında CaCl_2 ile çapraz bağlanmış GA yüklü NaAlg polimeriyle oluşturulan mikrokürelerin % Küre verimi (%KV) sonuçları Eş. 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Elde edilen mikrokürelerin küre verimleri %15,55-80,27 arasında değişmektedir. %KV ile elde edilen kürelerin polimer oranı arttıkça verim oranının da arttığını görülmektedir. Tablo incelendiğinde en verimli mikrokürenin GA/NaAlg oranı 1/8 olan ve çapraz bağlayıcıya 30 dk. maruz bırakılmış formülasyonla (D2) elde edildiği görülmektedir.

Çizelge 4.1. Hazırlanan mikrokürelerin verimi

Formülasyon No.	GA/NaAlg oranı	Çapraz bağlayıcı süresi (dk)	Küre verimi (%)
A1	1/1	15	30,95
A2	1/1	30	15,55
A3	1/1	45	56,55
B1	1/2	15	28,5
B2	1/2	30	51,63
B3	1/2	45	39,53
C1	1/4	15	70,36
C2	1/4	30	53,92
C3	1/4	45	56,00
D1	1/8	15	21,29
D2	1/8	30	80,27
D3	1/8	45	73,91

4.3. Mikrokürelerde Gallik Asidin Tutuklanma Verimi

Mikrokürelerde GA % tutuklanma verimi (%TV) Eş. 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2.'te gösterilmiştir. Tabloda 1/8 GA/NaAlg oranı sağlandığında tutuklama veriminde gözle görülür bir artış görülmektedir. Bu sonuçlara göre GA'yı en iyi tutuklayan D1 formülasyonlu mikroküreler olduğu görülmektedir. Ardından D2 ve D3 formülasyonlu mikrokürelerin tutuklama verimleri birbirlerine yakın olarak belirlenmiştir.

Elde edilen mikrokürelerin tutuklama verimleri %11,26-72,64 arasında değişmektedir. Sonuçlar incelendiğinde GA'nın en yüksek oranda hapsedildiği formülasyon olarak; %80,27 % KV ve %46,84 %TV ile D2 formülasyonlu mikroküreler (1/8 GA/NaAlg ve 30 dk. çapraz bağlanma) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Mikrokürelerin % tutuklama verimi

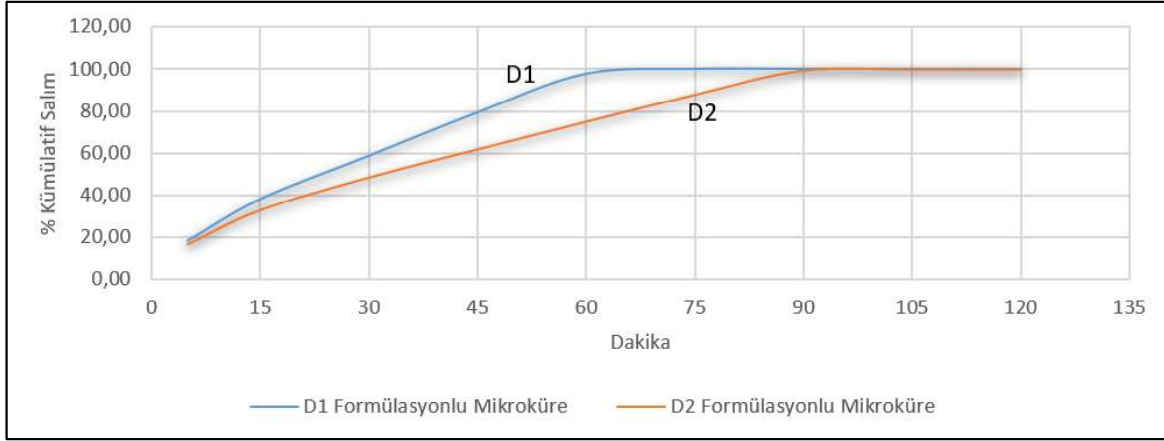
Formülasyon No.	GA/NaAlg oranı	Çapraz bağlayıcı süresi (dk)	GA (mg)	NaAlg (mg)	Tutuklama Verimi (%)
A1	1/1	15	200	200	15,70
A2	1/1	30	200	200	11,26
A3	1/1	45	200	200	11,53
B1	1/2	15	100	200	23,87
B2	1/2	30	100	200	15,06
B3	1/2	45	100	200	15,73
C1	1/4	15	50	200	39,75
C2	1/4	30	50	200	29,39
C3	1/4	45	50	200	28,38
D1	1/8	15	25	200	72,64
D2	1/8	30	25	200	46,84
D3	1/8	45	25	200	48,55

Li ve arkadaşlarının 2016'da yayınladıkları çalışmalarında aljinat polimeri ile elektrosprey metodu kullanılarak GA içeren boncuklar oluşturulmuştur. Oluşturulan boncukların GA yüklenme kapasitesinin %33-50 olduğu bildirilmiştir [83].

Babu ve arkadaşlarının 2007'de yayınladıkları çalışmalarında NaAlg ve metilselüloz ile suyağ emülsiyon yöntemi kullanılarak blend mikroküreler hazırlanmıştır. Çalışmalarında elde ettikleri mikrokürelerin tutuklama verimleri %61,5-79,8 arasında değişmektedir [98].

4.4. Gallik Asidin Mikrokürelerden Kontrollü Salımı

GA yüklü NaAlg polimeriyle oluşturulmuş mikrokürelerin %5 oranında CaCl_2 ile 15 dk. çapraz bağlanmış D1 ve 30 dk. çapraz bağlanmış D2 formülasyonlu mikrokürelerden salım çalışmaları pH 7.4'te 37°C'de gerçekleştirilmiştir, elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Mikrokürelerden GA'nın kümülatif salım grafiği

Grafik incelendiğinde GA'nın D1 formülasyonlu mikrokürelerden salımının ilk 60 dk.'da %100 oranda gerçekleştiği, D2 formülasyonlu mikrokürelerden ise ilk 60 dk.'da %80 oranında salındığı, %100'e ise 90 dakikada ulaşıldığı görülmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde D2 formülasyonlu mikrokürelerin D1 formülasyonlulara göre daha kontrollü bir salım performansı sergilediği belirlenmiştir.

4.5. Mikrokürelerin Denge Su İçeriği Tayini Sonuçları

D1 formülasyonu ile hazırlanmış kuru mikrokürelerin ağırlığı (W_k) 9 mg alınarak 24 sa distile suda bekletildiğinde oluşan şişmiş mikroküre ağırlığı (W_s) 88,09 mg elde edilmiştir. D1 formülasyonlu mikrokürelerin Eş. 3.8.'e göre hesaplanan % denge su içeriği %878 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

D2 formülasyonu ile hazırlanmış kuru mikrokürelerin ağırlığı (W_k) 3 mg alınarak 24 sa. distile suda bekletildiğinde oluşan şişmiş mikroküre ağırlığı (W_s) 7mg elde edilmiştir. D2 formülasyonlu mikrokürelerin Eş. 3.8.'e göre elde edilen % denge su içeriği %133 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Bu sonuçlar D1 formülasyonlu mikrokürelerin D2 formülasyonlulara göre daha çok suyu difüzyon yaparak daha çok şiştiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3.'te gösterilen salım verilerini destekleyerek D1 formülasyonlu mikrokürelerde meydana gelen daha hızlı salımı açıklamaktadır.

Çizelge 4.3. Mikrokürelerin denge su içeriği

Formülasyon no.	GA/NaAlg oranı	Çapraz bağlama süresi	Denge şişme oranı
D1	1/8	15 dk	%878
D2	1/8	30 dk	%133

Babu ve arkadaşlarının 2007’de yayınladıkları çalışmalarında NaAlg ve metilselüloz ile su-yağ emülsiyon yöntemi kullanılarak blend mikroküreler hazırlanmıştır. Çalışmalarında elde ettikleri mikrokürelerin % Su içerikleri %251-398 arasında değişmektedir [98].

Li ve arkadaşlarının 2016’da yayınladıkları çalışmalarında aljinat polimeri ile elektrosprey metodu kullanılarak GA içeren boncuklar oluşturulmuştur. Oluşturulan boncukların % Su içerikleri ıslak olduklarında %91-96,2; kuru olduklarında %23,4-%31,9 arasında değişmektedir [83].

4.6. Mikrokürelerin Çapraz Bağ Yoğunluğu Sonuçları

D2 formülasyonu ile hazırlanmış mikrokürelerin çapraz bağ yoğunluğu Eş. 3.3.-3.7. kullanılarak hesaplanmıştır.

Boş piknometre ağırlığı 20,7378 g ölçülmüştür (P0). Su dolu piknometre ağırlığı 70,5600 g ölçülmüştür (P1). Aseton dolu piknometre ağırlığı 60,2102 g ölçülmüştür (P2). Kuru ölçülebilen en az mikroküre ağırlığı 0,0029 g ölçülmüştür (G). Piknometrede aseton içinde mikroküre ağırlığı 60,2000 g ölçülmüştür (P3). Bu ölçümler sonucunda mikrokürenin yoğunluğu (d) Eş. 3.4. uygulanarak 0,1754 bulunmuştur.

Denge şişme hacmi ölçümü için Eş. 3.7. kullanılmıştır. Bu ölçüm için kuru ölçülebilen en az mikroküre ağırlığı 0,0029 g ölçülmüştür (W0). Bir gece suda bekletildikten sonra tartıldığında mikroküre 0,0257 g ölçülmüştür (Ws). Suyun hacmi 1 alınmıştır (P1). P2 olarak ifade edilen Eş. 3.4. uygulanarak bulunmuş olan 0,1754’dür. Sonuç olarak denge şişme hacmi 0,0393 olarak hesaplanmıştır.

Polimerin denge hacmi kesrinin hesaplanması için kuru ölçülebilen en az mikroküre ağırlığı 0,0029 g ölçülmüştür (W0). Denge şişme hacmi 0,0393 olarak hesaplanmıştır (V_{gl}). P2

olarak ifade edilen dküre Eş. 3.4. uygulanarak bulunmuş olan 0,1754'dür. Sonuç olarak polimerin denge hacmi kesri 0,4207 olarak hesaplanmıştır.

Molekül ağırlığının hesaplanmasında polimerin denge hacmi kesri Eş. 3.6. uygulanarak bulunmuş olan 0,4207'dir. Çözücü olarak kullanılan suyun hacmi 1 alınmıştır (V1). P2 olarak dküre ifade edilen Eş. 3.4. uygulanarak bulunmuş olan 0,1754'dür. χ_{12} ifade edilen etkileşim parametresi sabit olup sodyum aljinat için 0,597 alınmıştır [99]. Bu değerler kullanılarak Eş. 3.5.'e göre molekül ağırlığı (Mc) 0,088 olarak hesaplanmıştır.

Çapraz bağ yoğunluğu oluşturulan mikroküreler için mikrokürenin yoğunluğunun molekül ağırlığına oranı şeklinde ifade edilen Eş. 3.3.'e göre çapraz bağ yoğunluğu 1,99 mol/cm³ olarak hesaplanmıştır. D2 formülasyonlu mikrokürelerin çapraz bağ yoğunluğu hesabı sonuçları Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Çapraz bağ yoğunluğu sonuçları

Eş. 3.3.		
$P_x = dküre \div Mc$		
Dküre	Mikrokürenin yoğunluğu	0,1754
Mc	Molekül ağırlığı	0,088
Px	Çapraz bağ yoğunluğu	1,99
Eş. 3.4.		
$d = ((P_2 - P_0) \div (P_1 - P_0)) / (G + P_2 - P_3) \times G$		
P0	Boş piknometre ağırlığı	20,7378
P1	Piknometre+ dH ₂ O	70,56
P2	Piknometre+ sıvı (mikrokürenin çözünmediği, aseton)	60,2102
P3	Piknometre+sıvı+mikroküre	60,2
G	Kuru mikroküre ağırlığı	0,0029
Dküre	Mikrokürenin yoğunluğu	0,1754

Çizelge 4.4. (devam) Çapraz bağ yoğunluğu sonuçları

Eş. 3.5.		
$M_c = V_1 \times P_2 \times \left(\frac{[(V_{2m})^{1/3} - (V_{2m}/2)]}{(-\ln \frac{f_0}{f})} \left[(1 - V_{2m}) + V_{2m} + \chi_{12} \times [(V_{2m})^2] \right] \right)$		
V ₁	Solventin hacmi (su)	1
P ₂	dküre	0,1754
V _{2m}	Polimerin denge hacmi kesri	0,4207
X ₁₂	Interaction parameter (NaAlg)	0,597
M _c	Molekül ağırlığı	0,088
Eş. 3.6.		
$V_{2m} = W_0 / (V_{egl} \times P_2)$		
W ₀	Mikroküre ağırlığı	0,0029
V _{egl}	Denge şişme hacmi	0,0393
P ₂ =dküre	Mikrokürenin yoğunluğu	0,1754
V _{2m}	Polimerin denge hacmi kesri	0,4207
Eş. 3.7.		
$V_{egl} = W_0 / P_2 + (W_s - W_0) / P_1$		
W ₀	Mikroküre ağırlığı	0,0029
W _s	Şişmiş mikroküre (suda 1 gün bekletildi)	0,0257
P ₁	Solventin (suyun) hacmi	1
P ₂ =dküre	Mikrokürenin yoğunluğu	0,1754
V _{egl}	Denge şişme hacmi	0,0393

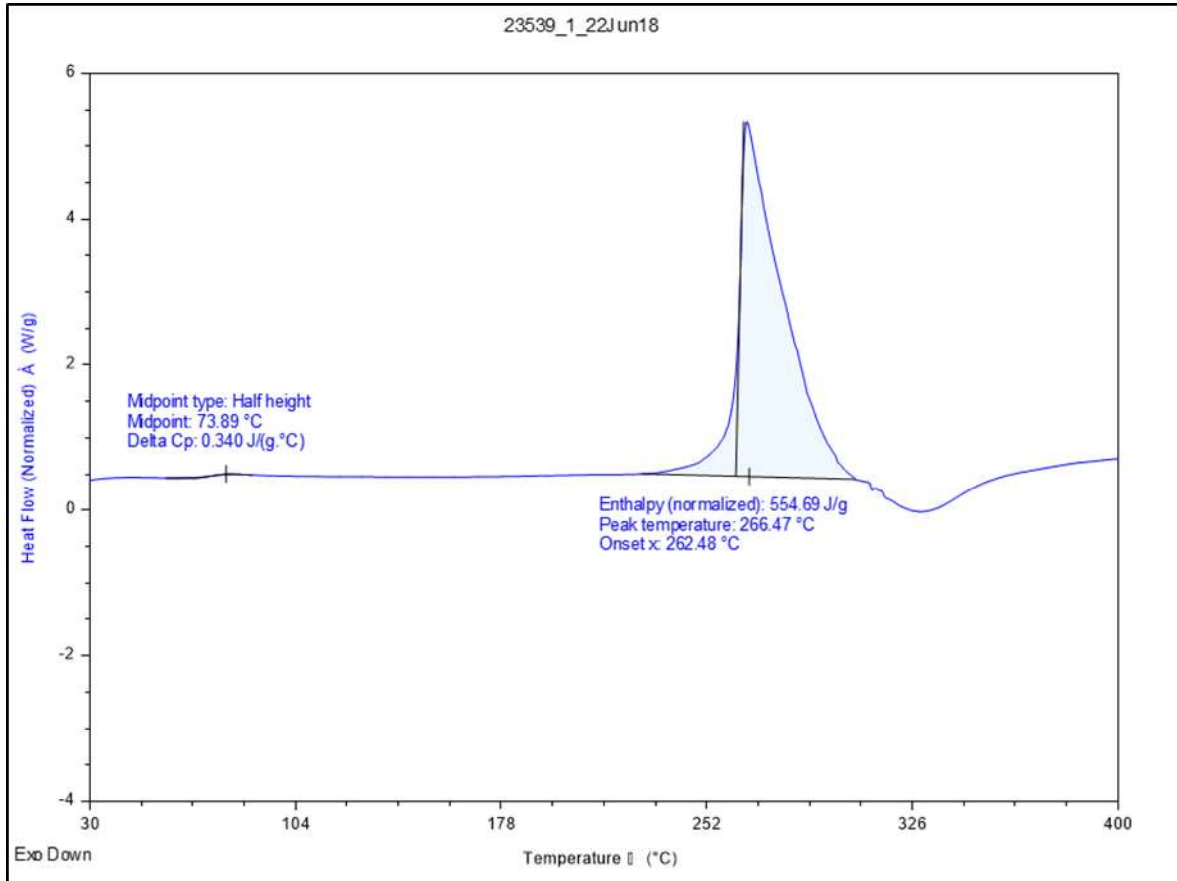
Kondolot Solak ve Şanlı 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında NaAlg ve poli vinil prolidon (PVP) kullanarak su ve aseton karışımını ayırmak için bir membran geliştirmiştir. Bu çalışmalarında NaAlg/PVP oranı 75/25 olarak kullandıklarında elde ettikleri membrandan çapraz bağ yoğunluğunu Flory Rehner eşitliğine göre $1,01 \times 10^{-3}$ mol/cm³ olarak

hesaplamışlardır [100].

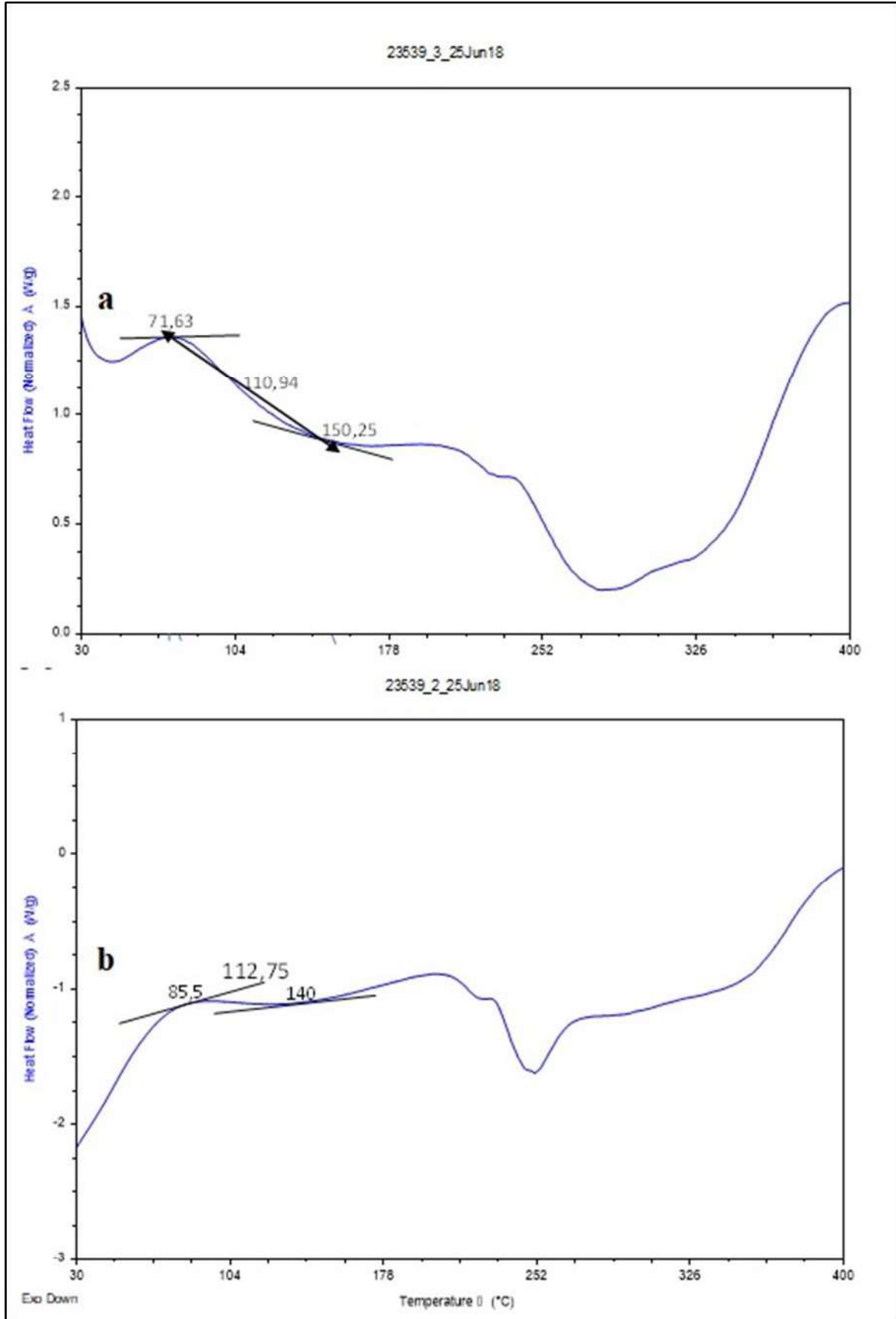
4.7. Mikrokürelerin DSC Termogramları

Mikrokürelerin termal özelliklerinin analizi amacı ile GA'nın ve elde edilen mikrokürelerin DSC analizleri yapılmıştır. GA'nın DSC termogramı Şekil 4.4.'te verilmiştir. Bu termogramda GA'nın 266,47°C'de eridiği keskin endotermik bir pik ile görülmektedir [74].

E2 formülasyonlu mikrokürelerin (30 dk. CaCl₂ ile çapraz bağlanmış GA içermeyen NaAlg mikroküreler) (a) ve D2 formülasyonlu mikrokürelerin (1/8 GA/NaAlg ve 30 dk. CaCl₂ ile çapraz bağlanmış mikroküreler) (b) DSC termogramları Şekil 4.5'da verilmiştir.



Şekil 4.4. Gallik asit DSC termogramı

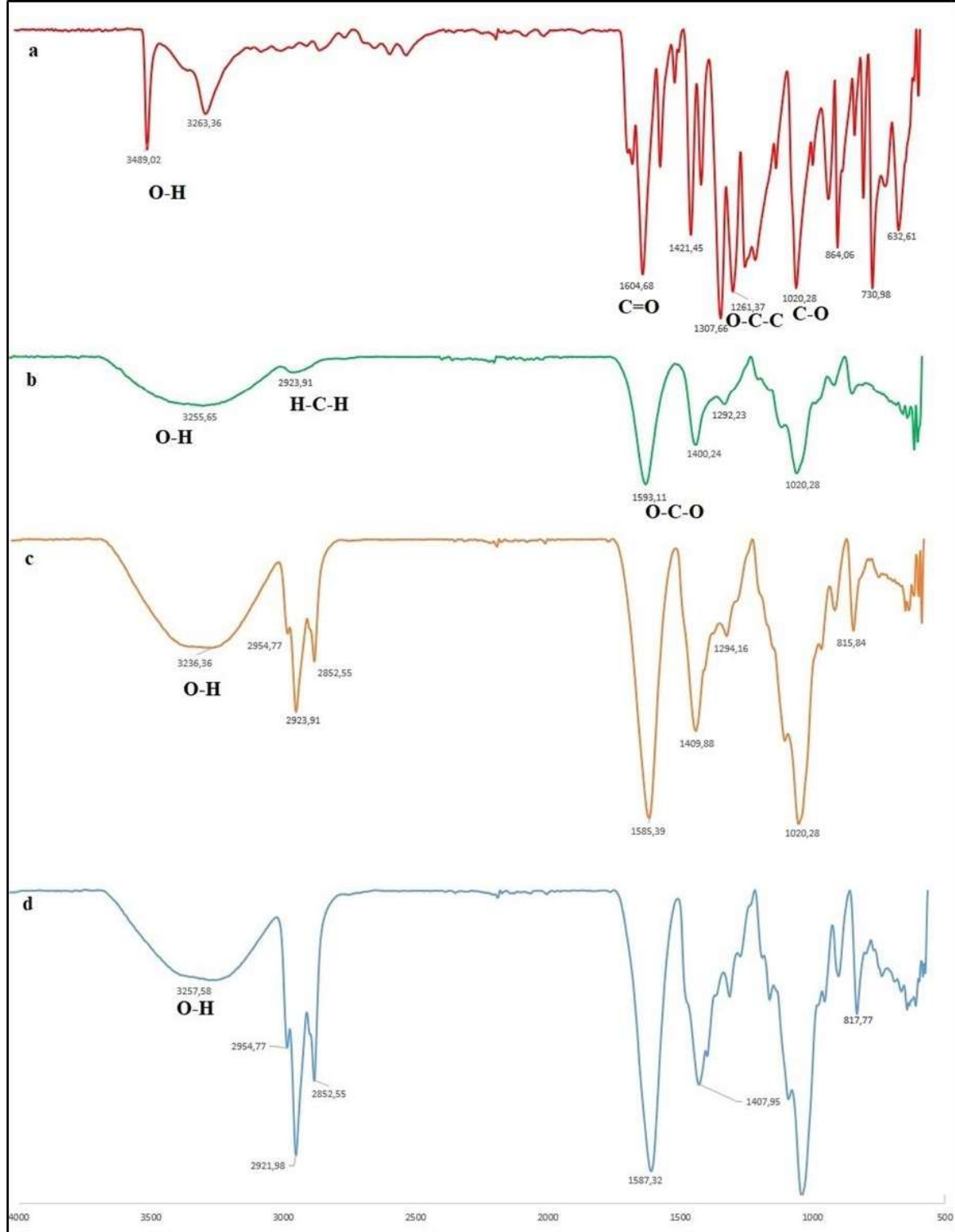


Şekil 4.5. Mikrokürelerin DSC termogramları, (a) E2 formülasyonlu mikroküreler, (b) D2 formülasyonlu mikroküreler.

D2 formülasyonlu mikrokürenin termogramı incelendiğinde GA'nın termogramında 266,47°C'de görülen endotermik pikin kaybolduğu görülmektedir. Ek olarak E2 formülasyonlu mikrokürede (30 dk. CaCl₂ ile çapraz bağlanmış GA içermeyen NaAlg mikroküreler) T_g değeri yaklaşık 110,94°C olarak, D2 formülasyonlu mikrokürede (1/8 GA/NaAlg ve 30 dk. CaCl₂ ile çapraz bağlanmış mikroküreler) ise yaklaşık 112,75°C olarak hesaplanmıştır [83, 101]. Bu artışın D2 formülasyonlu mikroküre içinde GA'nın hapsedilmesinden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

4.8. Mikrokürelerin FTIR Spektrumları

Her fonksiyonel grup kendine özgü FTIR spektrumuna sahiptir ve buna dayanarak moleküllerin kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Mikrokürelerin kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olmak için yapılan FTIR spektrumları Şekil 4.6.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Mikrokürelerin FTIR spektrumları (% Geçirgenlik/Dalga boyu cm^{-1}). (a) GA, (b) NaAlg, (c) E2 formülasyonlu mikroküreler, (d) D2 formülasyonlu mikrokürelerin FTIR spektrumları.

Bu spektrumlarda $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen bantların O-H grubuna ait gerilme bantlarıdır [76, 83].

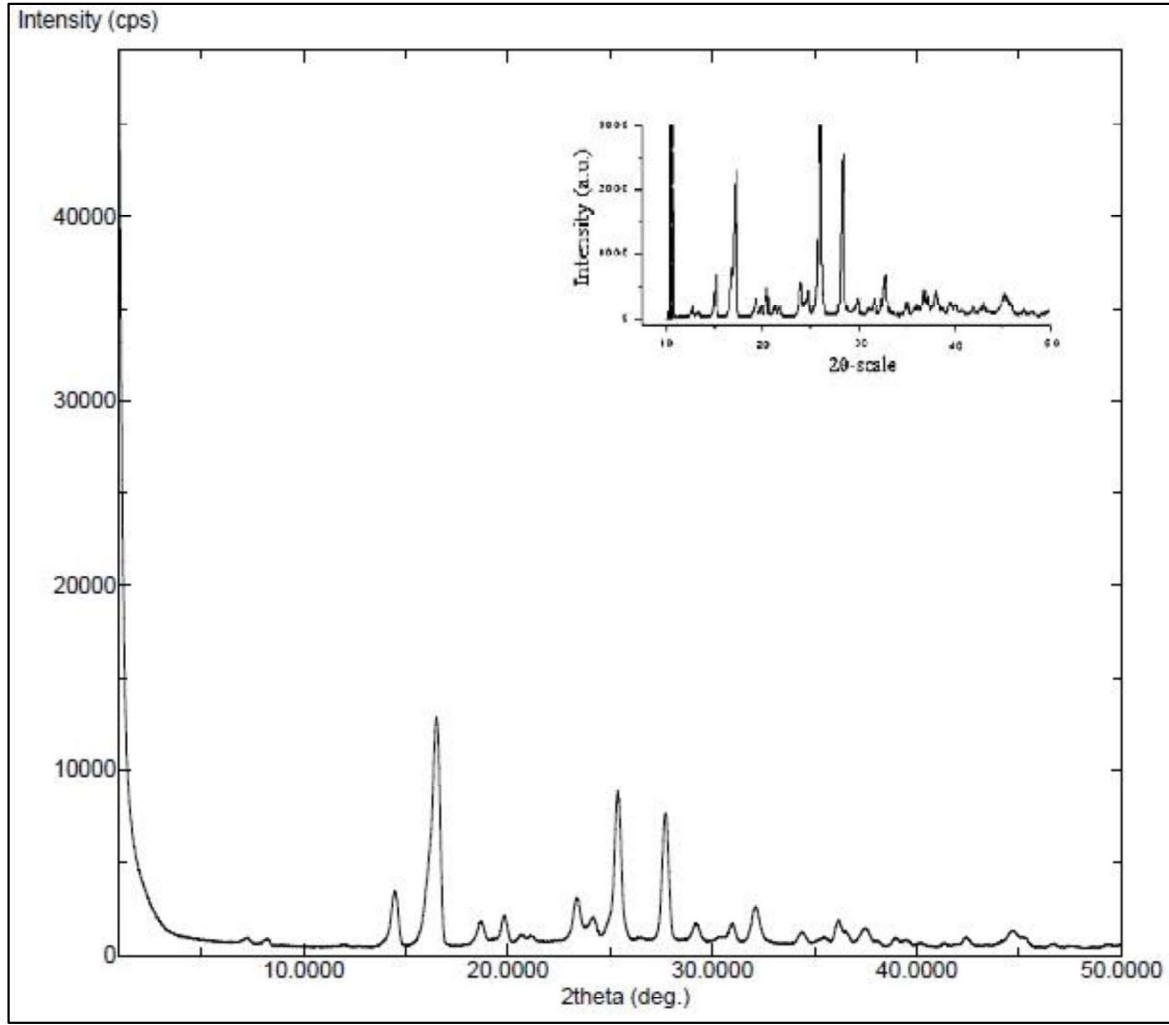
GA'nın FTIR spektrumunda yaklaşık 3489-3263 cm^{-1} 'de görülen spektrumlar O-H gerilmeleri ve hidrojen bağları nedeniyle görülmektedir [83]. 1604 cm^{-1} 'de görülen bant C=O bandına ait olduğu; 1421 cm^{-1} 'de görülen pikin aromatik zincire ait olduğu, 1261 cm^{-1} 'de görülen pikin O-C-C grubuna ait olduğu, 1020 cm^{-1} 'de görülen pikin C-O gruplarına aittir. Ek olarak 1026 cm^{-1} 'de görülen bant C-O bandına aittir. [76].

NaAlg'ın FTIR spektrumlarında görülen 2924 cm^{-1} 'de görülen bant CH_2 grubuna aittir. 1593-1400 cm^{-1} 'de görülen bantlar O-C-O grubuna aittir [101].

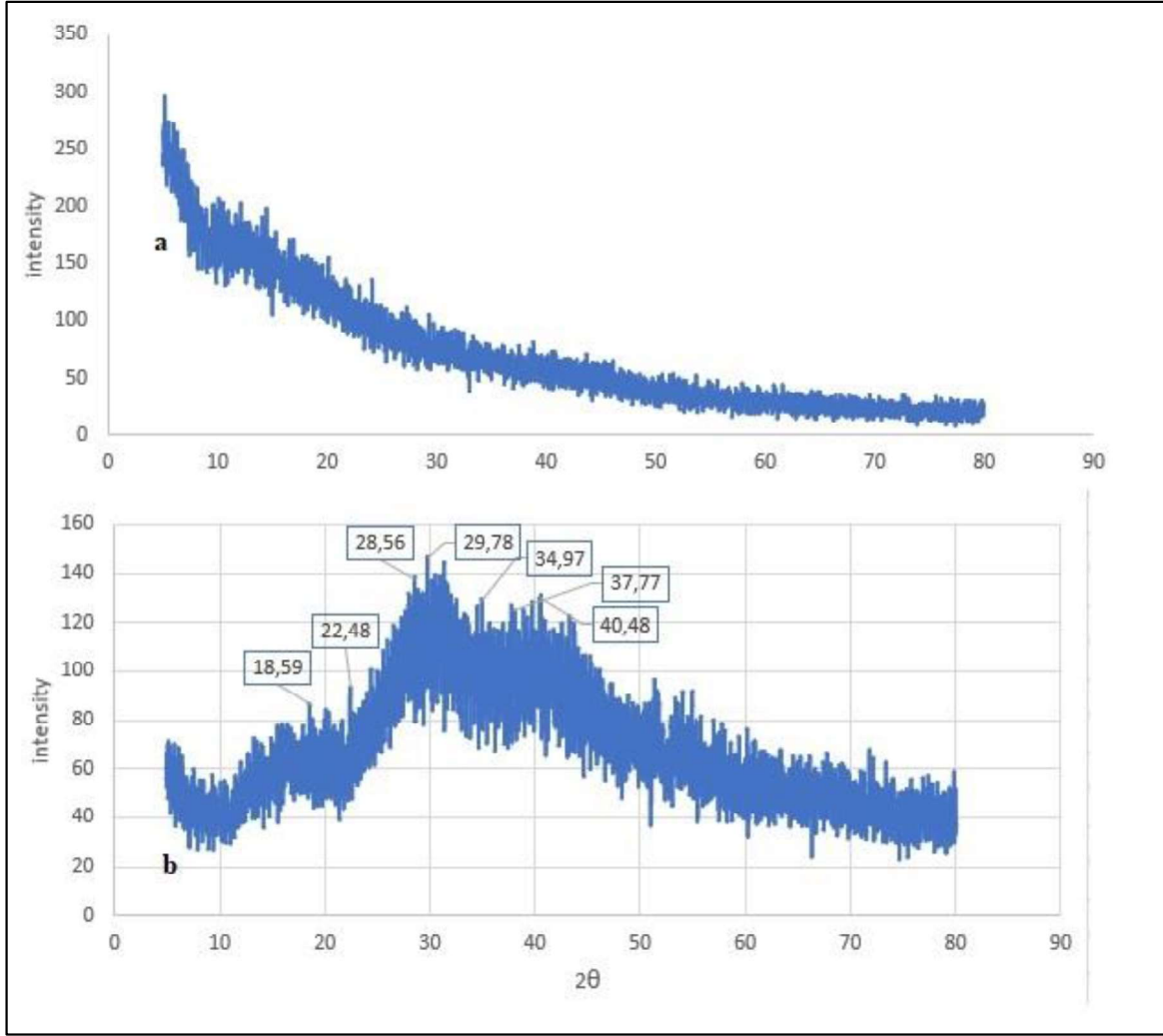
Mikrokürelerde 3000-3300 cm^{-1} 'de görülen bant O-H grubunu ifade etmekle birlikte yüksek miktardaki su miktarından dolayı NaAlg'ın spektrumundan oldukça geniş görülmektedir [83]. Mikrokürelerin spektrumlarında ise GA'nın 1604 cm^{-1} 'te bulunan karbonil grubu, D2 formülasyonlu mikrokürelerde 1587 cm^{-1} 'de görülmektedir. Bu bant E2 formülasyonlu mikrokürelerde 1585 cm^{-1} 'te bulunmaktadır [74, 76, 83, 101, 102]. Bu değişime ek olarak GA'nın karakteristik piklerinden 1020 cm^{-1} , GA yüklü mikrokürelerde görülen 1024 cm^{-1} pikinin şiddetinin artmasına neden olmuştur. Bu değişimlerin GA'nın enkapsülasyonundan kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

4.9. Mikrokürelerin XRD Eğrileri

Hazırlanan E2 (30 dk. CaCl_2 ile çapraz bağlanmış GA içermeyen NaAlg mikroküreler) ve D2 (1/8 GA/NaAlg ve 30 dk. CaCl_2 ile çapraz bağlanmış mikroküreler) formülasyonlu mikrokürelerin ve GA'nın X-ışınımı kırınimleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. GA'nın XRD eğrisinde görülen yoğun X-ışını kırınimleri kristal yapı pikleri görülmektedir. Bu materyalin kristalimsi bir yapıda olduğunu ifade eder [74]. Şekil 4.8.'da ise D2 formülasyonlu mikroküre ve E2 formülasyonlu mikrokürelerin XRD eğrileri verilmiştir.



Şekil 4.7. Gallik asit XRD eğrisi.



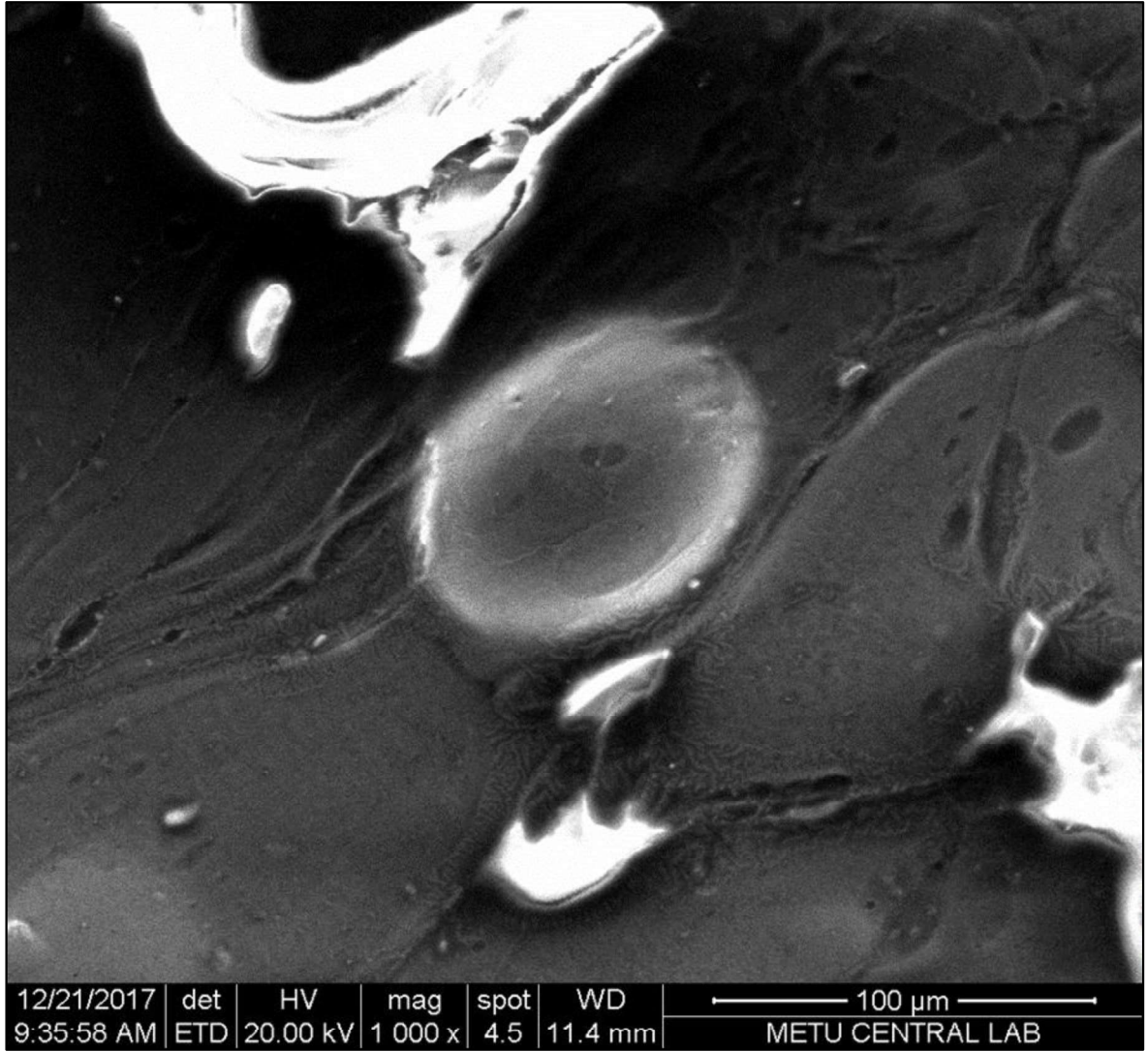
Şekil 4.8. Mikrokürelerin XRD eğrisi. (a) E2 formülasyonlu mikrokürelerin XRD eğrisi, (b) D2 formülasyonlu mikrokürelerin XRD eğrisi.

E2 formülasyonlu mikrokürelerin XRD eğrisinde polimerin homojen dağılmasına bağlı olarak belirgin bir pik görülmemiştir. GA'nın enkapsülasyonunu gösteren D2 formülasyonundaki mikrokürelerin XRD pikleri 28° - 40° arasındaki pikler olduğu görülmektedir [74, 101].

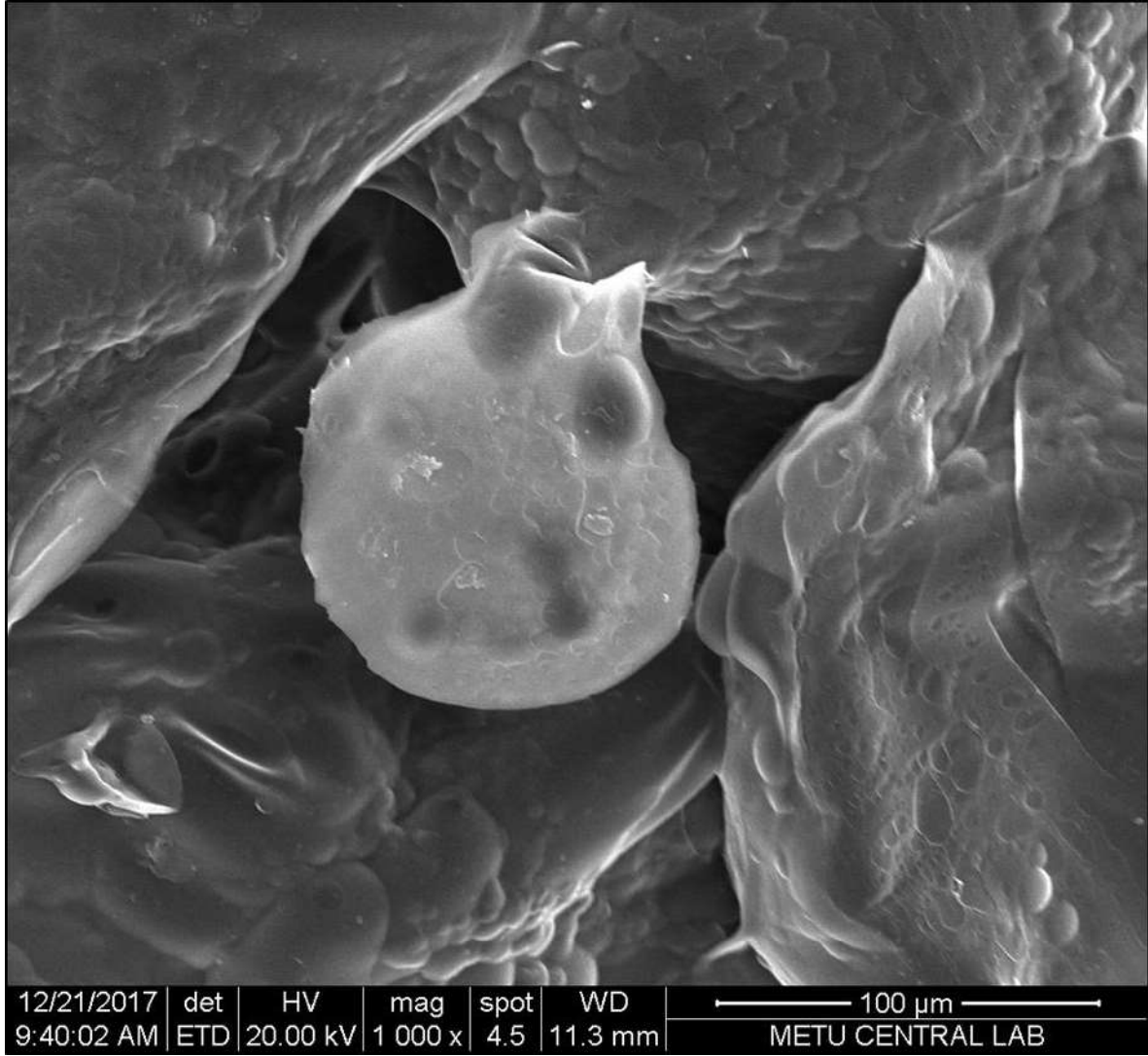
4.10. Mikrokürelerin SEM Görüntüleri

D2 formülasyonlu ($1/8$ GA/NaAlg ve 30 dk. CaCl_2 ile çapraz bağlanmış) bir mikrokürenin 1000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü Resim 4.2.'de verilmiştir. Bu görüntüde mikrokürenin çapı yaklaşık $117,24 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. E2 formülasyonlu (30 dk. CaCl_2 ile çapraz bağlanmış GA içermeyen NaAlg mikroküreleri) bir mikrokürenin 1000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü Resim 4.1.'de verilmiştir. Bu görüntüde mikrokürenin çapı yaklaşık $100 \mu\text{m}$

olarak hesaplanmıştır.



Resim 4.1. E2 formülasyonlu bir mikrokürenin SEM görüntüsü



Resim 4.2. D2 formülasyonlu bir mikrokürenin SEM görüntüsü

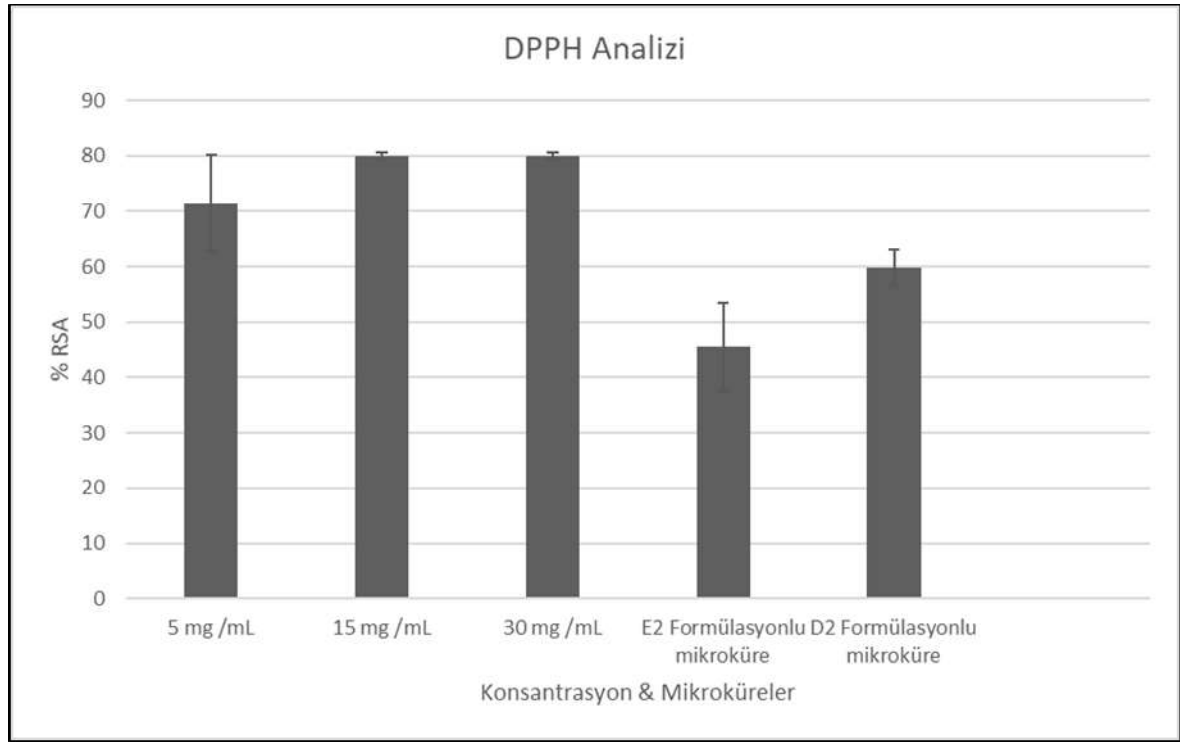
Babu arkadaşlarının 2007’de yayınladıkları çalışmalarında NaAlg ve metil selüloz ile su-yağ emülsiyon yöntemi kullanılarak blend mikroküreler hazırlanmıştır. Çalışmalarında elde ettikleri mikrokürelerin boyutları 312-418 µm arasında değişmektedir [98].

Li ve arkadaşlarının 2016’da yayınladıkları çalışmalarında aljinat polimeri ile elektrosprey metodu kullanılarak GA içeren küreler oluşturulmuştur. Oluşturulan kürelerin boyutları ıslak iken 209-1393 µm; kuru iken 156-1094 µm arasında değişmektedir [83].

4.11. Mikrokürelerin Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Mikroenkapsülasyon uygulamasının GA antioksidan aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 4.9’de verilmiştir. DPPH %inhibisyon

sonuçları Şekil 4.2.'deki gösterilmiştir.



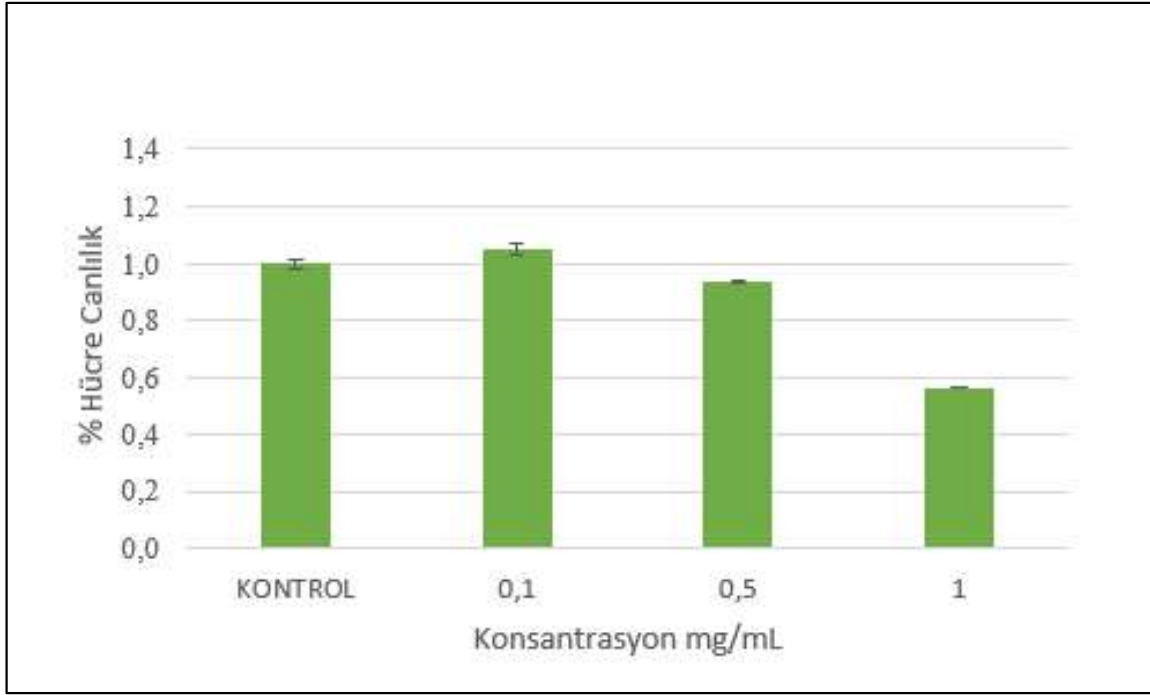
Şekil 4.9. DPPH % inhibisyon sonuçları

Standart GA, oluşturulan E2 ve D2 formülasyonlu mikrokürelerin antioksidan kapasiteleri DPPH radikali süpürme aktivitesi kapasiteleri ölçülmüş olup sonuçlar Şekil 4.9.'da verilmiştir. D2 formülasyonlu mikroküreler (0,1 g mikroküre, ~5 mg GA) %60 radikal süpürme aktivitesi (RSA) göstermiştir. E2 formülasyonlu mikroküreler (0,1 g mikroküre GA içermeyen) %45 radikal süpürme aktivitesi göstermiştir. 5 mg GA içeren D2 formülasyonlu mikroküreler 5 mg GA'dan daha az radikal süpürdüğü görülmektedir. Bunun nedeni mikroküreler içinde GA'nın enkapsüle halde kalıp yetersiz salımdan kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

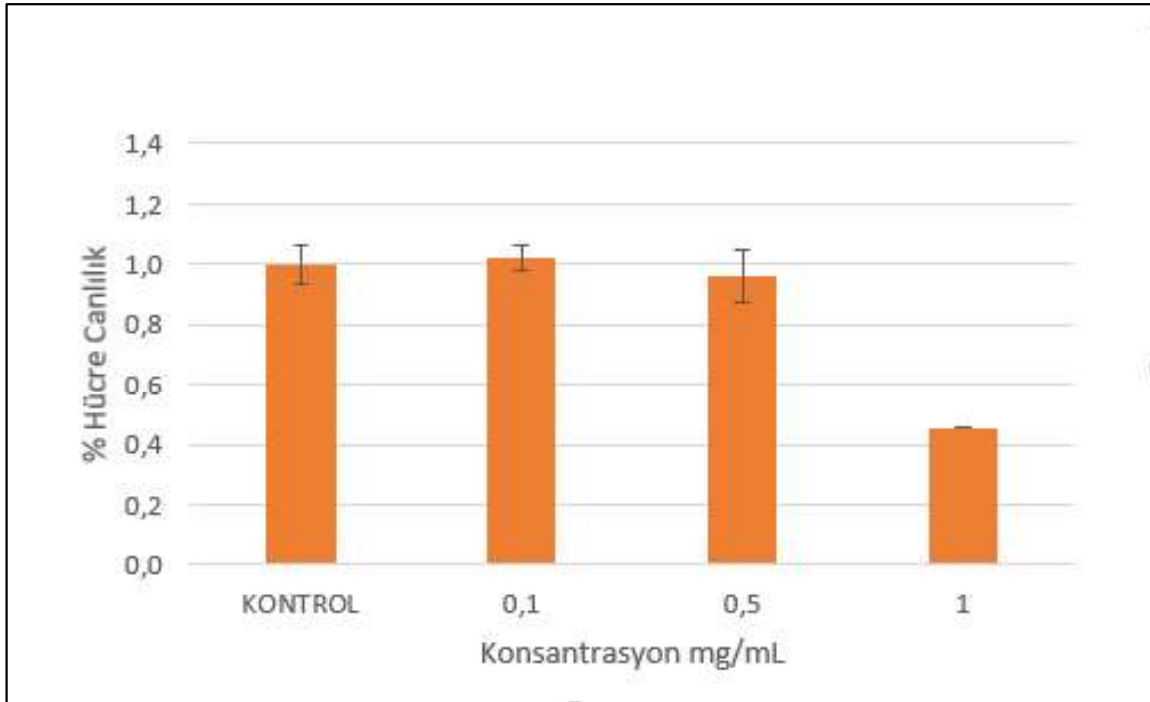
Mikroküreler içine enkapsüle edilmiş biyoaktif maddelerin çevredeki ısı, ışık, oksijen vb. faktörlerden korunduğu için antioksidan özelliğini korumaktadır [76, 77, 80].

4.12. Mikrokürelerin Sitotoksisite Çalışmaları

GA'nın enkapsülasyonunun antikanser özelliği üzerindeki etkisinin araştırılması için yapılan MTT analizi sonuçları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. D2 formülasyonlu mikrokürelerin 24 saatlik MTT analizi sonuçları



Şekil 4.11. D2 formülasyonlu mikrokürelerin 48 saatlik MTT analizi sonuçları

0,1 mg D2 formülasyonlu mikroküreler (5,2 $\mu\text{g/mL}$ GA) kontrolden belirgin bir farkla ayrılan sitotoksik etki göstermemiştir. 0,5 mg D2 formülasyonlu mikroküreler (26,02 $\mu\text{g/mL}$ GA) zayıf bir sitotoksik aktivite göstermiş olup 24 saat ve 48 saat arasında belirgin bir fark

mevcut değildir. 1 mg D2 formülasyonlu mikroküreler (52 µg/mL GA) kontrole göre önemli bir sitotoksik aktivite göstermiştir (%45).

Elde edilen veriler değerlendirilerek GA yüklü mikrokürelerin Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin IC₅₀ değeri 24 ve 48 saat için sırasıyla 1,18 mg/ml ve 1,02 mg/ml dir. GA'nın sitotoksik etkilerinin IC₅₀ değeri 24 ve 48 saat için sırasıyla ~61,417 µg/mL GA ve 53,089 µg/mL dir.

Rosman ve arkadaşlarının 2018'de yayınlanan çalışmalarında GA içeren nanokompozitler hazırlanmış, %35 GA yüklü bu nanokompozitlerin kolon (HT-29), meme (MCF-7) ve akciğer (A549) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saat süreyle incelenmiştir. GA'nın IC₅₀ değeri HT-29 hücre hattı için 14,52±0,94 µg/mL, MCF-7 hücre hattı için 21,35 ±4,14 µg/mL, A549 hücre hattı için 56.49 ± 4.31 µg/mL olarak ifade edilmiş [84].

Subramanian ve arkadaşlarının 2016'da bir kolon kanseri hücre hattı olan HCT-15 üzerinde GA'nın apoptotik etkisini inceledikleri çalışmalarında yaklaşık 740 µmol/L IC₅₀ değerinde önemli bir inhibisyon sağlanmıştır [103].

Forester ve arkadaşlarının 2010'da yaptıkları çalışmalarında GA'nın de içinde bulunduğu bazı moleküllerin 72 sa inkübasyon ile Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi incelenmiştir. Bu inceleme sonucu Caco-2 hücreleri üzerinde GA 68,7 µmol ile IC₅₀ değerine ulaşmıştır [16].

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde GA yüklü mikrokürelerin Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin doza ve zamana bağlı olarak arttığı görülmektedir. Benzer şekilde Subramania (2016) tarafından HCT-15 kolon kanser hücreleri üzerinde yapılmış olan çalışmada GA'nın doza ve süreye bağlı olduğu ifade edilmektedir [103]. GA yüklü mikroküreler 48 saatte 24 saatten daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Diğerlerine göre en iyi sitotoksik etki 1 mg/mL konsantrasyonunda sağlanmıştır. Kontrole yakın hücre canlılığının nedeni ticari sodyum aljinat ürünlerinin sahip olduğu mitojenik kontaminantlar olabilir [52].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan sağlığı için yararlı birçok etkisi bulunan GA güçlü bir antioksidandır ve çeşitli kanser türleri üzerinde antikanser aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır [9-20]. Bu özelliğinin yanı sıra antiinflamatuvar, antidiyabetik, antianjiojenik, antibakteriyel, antiviral, antifungal gibi birçok biyoaktif özelliğe de sahiptir [9-20]. Tüm bunların yanında GA'nın da içinde bulunduğu polifenol grupları ısı, ışık ve oksijen varlığı gibi çevresel faktörlerden etkilenerek aktivite kayıplarına uğramaktadır [55]. Bu nedenle GA ve benzeri biyoaktif moleküllerin, kontrollü salım sistemleri vasıtasıyla hedef bölgelere ulaştırılmaları oldukça önemlidir. Bu çalışmada doğal ve biyobozunur bir polimer olan NaAlg ile polimerin çapraz bağlayıcısı olarak $CaCl_2$ kullanılarak su-yağ-su emülsiyon yöntemi ile GA taşıyan mikroküre oluşturulmuştur.

GA/NaAlg oranı 1/1, 1/2, 1/4 ve 1/8 olmak üzere 4 farklı oranda hazırlanmış ve en uygun GA taşıyan sistemin GA/NaAlg etken madde/polimer oranının 1/8 olarak belirlenmiştir. Mikrokürelerin polimer oranının artmasına bağlı olarak mikroküre verimlerinin arttığı gösterilmiştir. Farklı oranlarda hazırlanmış mikrokürelerin $CaCl_2$ ile çapraz bağlanma süreleri 15, 30 ve 45 olmak üzere 3 farklı sürede denenmiş ve en uygun çapraz bağlayıcı süresinin 30 dk. olduğu belirlenmiştir. Elde edilen mikroküre verimleri %15 ile %80 arasında değişmiştir. Bu mikrokürelerin tutuklama verimleri %11 ile %72 arasında değişmiştir. Bu veriler sonucunda en iyi küre ve tutuklama verimleri yüksek olan D1 ve D2 formülasyonlu mikrokürelerin pH 7.4 ortamında salım profilleri incelenmiş ve denge su içerikleri tayin edilmiştir. Mikrokürelerin salım sonuçları neticesinde GA'nın tamamını salım süreleri D1 formülasyonlu mikrokürelerin 60dk, D2 formülasyonlu mikrokürelerin 90 dk. olarak belirlenmiştir. Mikrokürelerin % denge su içerikleri D1 formülasyonlu mikrokürelerin %133, D2 formülasyonlu mikrokürelerin %878 olarak belirlenmiştir. Mikrokürelerin çapraz bağlanma süresi arttıkça şişme oranı düşmüş ve GA'nın daha uzun süre salınmasını sağlamıştır.

Mikrokürelerin kontrollü salım verileri incelendiğinde D2 formülasyonlu mikrokürelerin daha kontrollü bir salım performansı sergilediği görülmüştür.

D2 formülasyonlu mikrokürelerin çapraz bağ yoğunluğu $1,99 \text{ mol/cm}^3$ olarak belirlenmiştir.

Mikrokürelerin karakterizasyon çalışmalarında FTIR, DSC, SEM ve XRD analizleri kullanılmıştır. Bu analizler neticesinde mikroküreler içerisinde GA'nın homojen bir şekilde tutuklandığı gösterilmiş ve mikrokürelerin yüzey morfolojileri incelenerek küresel bir formda olduğu görülmüştür.

Mikroenkapsülasyonun GA'nın antioksidan aktivitesi üzerine etkisi DPPH radikali süpürme kapasitesi ölçülerek araştırılmıştır ve mikroküreler içindeki GA'nın antioksidan aktivitesini koruduğu (%59,83) gösterilmiştir.

Antikanser aktivite kolon epidermal adenokarsinom hücrelerinden Caco-2 hücre serisi üzerinde MTT analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda antikanser aktivitenin doza ve zamana bağlı olarak korunduğu görülmüştür.

Sonuç olarak GA su-yağ-su emülsiyon yöntemiyle NaAlg polimeri ile başarılı bir şekilde enkapsüle edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları ile desteklenmiştir. Mikroenkapsülasyonun GA'nın antioksidan ve antikanser aktivitelerini koruduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen GA yüklü NaAlg mikrokürelerin potansiyel ilaç olarak değerlendirilebilmesi için gerekli diğer deneysel çalışmaların yapılması, benzer yöntemler kullanılarak farklı etken maddeler içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi önerilmektedir. Bu araştırmadan elde edilen veriler ışığında ülkemiz ekonomisine katkı sağlayacak önemli potansiyel ilaçların geliştirilebileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Durmuş, N. (2019). *Kontrollü salım yapan kapsül gübre geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul,1.
2. Masuda, M. (2011). *Microencapsulation of pesticides for controlling Release from coatings*, Doktora Tezi, Chalmers University of Technology Department of Chemical and Biological Engineering, Göteborg, 1-7.
3. Olukman, M. (2010). *Kanser ilacı 5-Fluorourasilin iyonik çapraz bağlı aljinat assail mikrokürelerden pH controlled salımı*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-6.
4. Zungur, A. (2013). *Mikroenkapsülasyon işleminin ekstra sızma zeytinyağı tozunun depolanması sırasında oksidatif stabilite sorpsiyon ve fiziksel kalite kriterleri üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 15-18.
5. Gençosman, A. (2017). *Preparation and characterization of microcapsules for cleaning products and cosmetics*, Yüksek Lisans Tezi, Yeditepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-3.
6. Şimşek, Ş. (2007). *Büyüme hormonu (Somatotropin) içeren biyolojik olarak parçalanabilen mikrokürelerin hazırlanması*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 35-37.
7. Gross, R.A. ve Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for environment. *Science* 297(5582), 803–807.
8. Lee, K. Y. ve Mooney, D. J. (2011). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.
9. Locatelli, C., Flippin-Monterio F. B. ve Creczynski-Pasa T. B. (2013). Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 233-239.
10. You, B. R., Kim, S. Z., Kim, S. H. ve Park, W. H. (2011). Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 357, 295-303
11. Verma, S., Singh, A., and Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35, 473-485.
12. Mansouri, M. T., Naghizadeh, B., Ghorbanzadeh, B., Farbood, Y., Sarkaki, A., and Bavarsad, K. (2013). Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 111, 90-96.
13. Kaur, M., Velmurugan, B., Rajamanickam, S., Agarwal, R., and Agarwa, C. (2009). Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative,

- proapoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharmaceutical Research*, 26(9), 2133-2140.
14. Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., Katakowski, M., Choppb, M., and To, S. T. (2010). Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European Journal of Pharmacology*, 641, 102–107.
 15. Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H. L., Krupitza, G., Bernhaus, A., Fritzer-Szekeres, M., and Szekeres, T. (2007). Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, 245, 156–162.
 16. Forester, S. C. and Waterhouse, A. L. (2010). Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5320-5327.
 17. Wang, S., Miura, M., Jung, Y. K., Zhu, H., Li, E., and Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*, 92, 501–509.
 18. Nayeem, N., Smb, A., Salem, H and Ahel-Alfgy, S. (2016). Gallic acid: A promising lead molecule for drug development. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8(2), 213.
 19. Chen, H., Wu, Y., Chia, Y., Chang, F., Hsu, H., Hsieh, Y., Chen, C., and Yuan, S. (2009). Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 286, 161–171.
 20. Liu, Z., Li, D., Yu, L., and Niu, F. (2012). Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Experimental Chemotherapy*, 58, 185-194.
 21. Saini, S., Kumar, S., Choudhary, M., Budhwar, N., and Budhwar V. (2018). Microspheres as controlled drug delivery system: an updated review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(5), 1760-1768.
 22. Tarançı, Ö. (2014). *Bazı bitki ekstraktlarının kanser hücrelerinde antioksidan, antikanserojenik ve apoptotik etkisinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 24-26.
 23. Oylar, Ö., ve Tekin, İ. (2011). Kanserın teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin önemi. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 16(1), 147-154.
 24. Rajgor, N., Patel, M., and Bhaskar, V. H. (2011). Implantable drug delivery system: An Overview. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2(2), 91-95.
 25. Chaurasia, M., Chaurasia, M. K., Jain, N.K., Jain, A., Soni, V., Gupta, Y., and Jain, S. K. (2006). Cross-linked guar gum microspheres: A viable approach for improved

- delivery of anticancer drugs for the treatment of colorectal cancer. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 7(3), 1-9.
26. Wary, R., Sivaraj, S., Karthikeyan G., Kumar, R., Suraj S. L. M., Dasararaju, G., and Kannayiram, G. (2014). Chitosan gallic acid microsphere incorporated collagen matrix for chronic wounds: Biophysical and biochemical characterization. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 94-100.
 27. Maestrelli, F., Zerrouk, N., Cirri, M., and Mura, P. (2015). Comparative evaluation of polymeric and waxy microspheres for combined colon delivery of ascorbic acid and ketoprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 485, 365-373.
 28. Muvaffak, A., Gurhan, I., and Hasirci, N. (2004). Prolonged cytotoxic effect of colchicine released from biodegradable microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research*, 71B(2), 295-304.
 29. Olukman, M., Sanli, O., and Kondolot Solak, E. (2012). Release of anticancer drug 5-Fluorouracil from different ionically crosslinked alginate beads. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, 469-479.
 30. Zhang, Z., Wang, X., Li, B., Hou, Y., Yang, J., and Yi L. (2018). Development of a novel morphological paclitaxel-loaded PLGA microspheres for effective cancer therapy: in vitro and in vivo evaluations. *Drug Delivery*, 25(1), 166-177.
 31. Bora, A. F., Li, X., Zhu, Y., and Du, L. (2018). Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-10.
 32. Beshbishy, A. M., Batiha, G. E., Yokoyama, N., and Igarash, I. (2019). Ellagic acid microspheres restrict the growth of Babesia and Theileria in vitro and Babesia microti in vivo. *Parasite Vectors*, 12(269), 1-13.
 33. Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Zorrilla, S. E., and Sihufe, G. A. (2019). Natural astaxanthin encapsulation: Use of response surface methodology for the design of alginate beads. *Journal of Biological Macromolecules*, 121, 601-608.
 34. Karmakar, U., and Faysal, M. (2009). Diclofenac as microspheres. *Internet Journal of Third World Medicine*, 8(1), 114-117.
 35. Kadam, N. R., and Suvarna, V. (2015). Microspheres: A brief review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5(47), 13-19.
 36. Sree Giri Prasad, B., Gupta V. R. M., Devanna, N., and Jayasurya, K. (2014) Microspheres as drug delivery system- A review. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 1961-1972.
 37. Kumar, A., Jha, S., Rawal, R., Chauhan, P. S., and Maurya, S. D. (2013). Mucoadhesive microspheres for novel drug delivery system: A review. *American Journal of PharmTech Research*, 3(4), 196-213.
 38. Kakar, S., Batra, D., Singh, R., and Nautiyal, U. (2013). Magnetic microspheres as magical novel drug delivery system: A review. *Journal of Acute Disease*, 1-12.

39. Mukund, J. Y., Kantilal, B. R., and Sudhakar, R. N. (2012). Floating microspheres: A review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1), 17-30.
40. Singh, C., Purohit, S., Singh, M., and Pandey, B. L. (2013). Design and evaluation of microspheres: A review. *Journal of Drug Delivery Research*, 2(2), 19-27.
41. Er, A. (2014). *Ketorolak trometaminin karboksimetil Selüloz/Poli (Vinil alkol) mikrokürelerden kontrollü salımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-17, 29.
42. Danckwets, M. and Fassihi, A. (1991). Implantable Controlled Release drug delivery systems: A review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(11), 1465-1502.
43. Kaş, S. (2014). *Kontrollü salım sistemleri (İkinci Baskı)*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları, 74-76.
44. Atak, E., Yıldız, E., ve Uslu, M. E. (2017). Fenolik bileşiklerin enkapsülasyonu. *Manisa Celal Bayar Üniversitesi Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 24(2), 82-92.
45. Türkmen, B. (2008). *Yüzen mikroküre formülasyonlarından etkin madde çıkışını etkileyen parametrelerin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 21-25.
46. Ramesh, N., Moratti, S. C., and Dias, G. J. (2018). Hydroxyapatite–polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 1068(5), 2046–2057.
47. İnternet: Algaebase, *Laminaria digitata* (Hudson) J.V.Lamouroux. URL: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=k5d62c0fee252c92b. Son Erişim Tarihi: 03.07.2019.
48. İnternet: Compound Summary: Sodium alginate. U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-alginate>. Son Erişim Tarihi: 27.06.2019.
49. Fu, S., Thacker, A., Sperger, D. M., Boni, R. L., Buckner, I. S., Velankar, S., Munson, E. J., and Block, L. H. (2011). Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(2), 453-460.
50. Sachan, N. K., Pushkar, S., Jha, A., and Bhattacharya, A. (2009). Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*, 2(8), 1191-1199.
51. Shilpa, A., Agrawal, S. S. and Ray, A. R. (2003). Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *Journal of Macromolecular Science*, 43(2), 187-221.
52. Wee, S. and Gombotz, W. R. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267–285.

53. Milner, J. A. (1994). Reducing the risk of cancer. *In Functional Foods*, 39-70.
54. Duthie, G. G. and Brown, K. M. (1994). Reducing the risk of cardiovascular disease. *In Functional Foods*, 19-38.
55. Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
56. Wang, H., Cao, G., and Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.
57. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
58. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
59. Guo, J. J., Hsieh, H. Y., and Hu, C. H. (2009). Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, 15699-15708.
60. Perron, N. R., and Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75-100.
61. Zhou, B., Wu, L. M., Yang, L., and Liu, Z. L. (2005). Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 78-84.
62. Du, Y., Guo, H., and Lou, H. (2007). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1695-1701.
63. Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107-112.
64. Manach, C. and Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 38(8), 771-785.
65. Williamson, G., Barron, D., Shimoi, K., and Terao, J. (2005). In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Research*, 39(5), 457-469.
66. Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., and Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2), 220-235.
67. Ossipov, V., Salminen, J. P., Ossipova, S., Haukioja, E., and Pihlaja, K. (2003). Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 3-16.

68. İnternet: Compound Summary: Gallic acid. U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid. Son Erişim Tarihi: 27.06.2019.
69. Turhanlar, E. (2014). *Gallik Asitin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 14.
70. Yoon, C., Chung, S., Lee, S., Park, Y., Lee, S., and Park, M. (2013). Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, 80, 274-279.
71. Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L., and Oteiza, P. I. (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Molecular Carcinogenesis*, 53, 432–439.
72. Chuang, C., Liu, H., Wu, L., Chen, C., Chang, J., and Hsu, S. (2010). Gallic acid induced apoptosis of lung fibroblasts via a reactive oxygen species-dependent ataxia telangiectasia mutated-p53 activation pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2943-2951.
73. Liu, K. C., Ho, H. C., Huang, A. C., Ji, B. C., Lin, H. Y., Chueh, F. S., Yang, J. S., Lu, C. C., Chiang, J. H., Meng, M., and Chung, J. G. (2013). Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. *Environmental Toxicology*, 28(10), 579-587.
74. Singh, D., Maniyari Rawat, M. S., Semalty, A., and Semalty, M. (2011). Gallic acid-phospholipid complex: Drug incorporation and physicochemical characterization. *Letters in Drug Design & Discovery*, 8, 284-291.
75. Medina-Torres, L., García-Cruz, E. E., Calderas, F., González Laredo, R. F., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., and Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *Food Science and Technology*, 50, 642-650.
76. Da Rosaa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R. C., Nunes, M. R., Benvenutti, E. V., Luz, S. R., D'Avila, R. F., and Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, beta-cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138– 146.
77. Neo, Y. P., Ray, S., Jin, J., Gizdavic-Nikolaidis, M., Nieuwoudt, M. K., Liu, D., and Quek, S. Y. (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. *Food Chemistry*, 136, 1013-1021
78. Warya, R., Sivaraja, S., Gurukarthikeyana, Kumara, R., Suraja, P. S. L., Dasararaju, G., and Kannayiram, G. (2014). Chitosan gallic acid microsphere incorporated collagen matrix for chronic wounds: Biophysical and biochemical characterization *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 94-100.

79. Dorniani, D., Saifullah, B., Barahuie, F., Arulselvan, P., Hussein, M. Z. B., Fakurazi, S., and Twyman, L. J. (2016). Graphene oxide-gallic acid nanodelivery system for cancer therapy. *Nanoscale Research Letters*, 11(491), 1-9.
80. Aytac, Z., Kusku, S. I., Durgun, E., and Uyar, T. (2016). Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. *Materials Science and Engineering C*, 63, 231-239.
81. Shrivastava, S., Gidwani, B., Gupta, A., and Kaur C. D. (2016). Preparation and characterization of microspheres containing gallic acid. *Advance Pharmaceutical Journal*, 1(4), 95-100.
82. Alonso, C., Marti, M., Barba, C., Lis, M., Rubio, L., and Coderch, L. (2016). Skin penetration and antioxidant effect of cosmeo-textiles with gallic acid. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 156, 50–55.
83. Li, J., Kim, S. Y., Chen, X., and Park, H. J. (2016). Calcium-alginate beads loaded with gallic acid: Preparation and characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 667-673.
84. Rosman, R., Saifullah, B., Maniam, S., Dorniani, D., Hussein, M. Z., and Fakurazi, S. (2018). Improved anticancer effect of magnetite nanocomposite formulation of gallic acid (Fe₃O₄-PEG-GA) against lung, breast and colon cancer cells. *Nanomaterials*, 8(83), 1-14.
85. Qi, B., Zhang, Q., Sui, X., Wang, Z., Li, Y., and Jiang, L. (2016). Differential scanning calorimetry study: Assessing the influence of composition of vegetable oils on oxidation. *Food Chemistry*, 194, 601-607.
86. Kara, S. (2019). *Karnauba ve Balmumu Vaksları ile Hazırlanan Oleojellerin DSC ve FT-IR Spektroskopisi İle Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 19-20.
87. Davis, R., and Mauer, L. J. (2010). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1582-1594.
88. Toyran, N. (2008). Fourier Transform İnfrared Mikrospektroskopi Tekniği. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 28(5), 704-714.
89. Beşerengil, B. (2015). *Enstrümental Analiz Temel İlkeler*. İzmir: Gazi Kitabevi, 495-496.
90. İnternet: Atom Enerjisi Kurumu: Malzeme Teknolojisi Taramalı Elektron mikroskobu (SEM) Nasıl Çalışır? Ne İşe Yarar? URL: <http://www.taek.gov.tr/tr/sik-sorulan-sorular/148-malzeme-teknolojisi-sss/948-taramali-elektron-mikroskobu-sem-nasil-calisir.html> Son Erişim: 19.07.2019.
91. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.

92. Ionita, P. (2005). Is DPPH Stable free radical a good scavenger for oxygen active species? *Chemical Paper*, 59(1), 11-16.
93. Terzioglu, G., Keskin, A. Ü., ve Demirel Yanıkkaya, G. Hücre proliferasyonu ölçüm yöntemleri ve çeşitli ticari proliferasyon kitlerinin karşılaştırılması. (2013). *Turkish Journal of Immunology* ,1(3), 74-89.
94. Bresca, P. and Banks, P. (2009). Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. *Biotek Application Note*. Biotek Instruments, Winooski, USA.
95. Arizmendi-Cotero, D., Villanueva-Carvajal, A., Gomez-Espinosa, R.M., Dublan Garcia, O., and Dominguez-Lopez, A. (2017). Radical scavenging activity of an inulin-gallic acid graft and its prebiotic effect on *Lactobacillus acidophilus* in vitro growth. *Journal of Functional Foods*, 29, 135-142.
96. Weingerl, V., Matija Strlic, M., and Kocar, D. (2009). Comparison of methods for determination of polyphenols in wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and spectrophotometry. *Acta Chimica Slovenica*, 56(3), 689-703.
97. Liu C., Chen, C., Mo, H., Ma, H., Yuan, E., and Li, Q. (2014). Characterization and DPPH radical scavenging activity of gallic acid-lecithin complex. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(8), 1333-1338.
98. Babu, V. R., Sairam, M., Hosamani K. M., and Aminabhavi, T. M. (2007). Preparation of sodium alginate–methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine. *Carbohydrate Polymers*, 69, 241-250.
99. Kulkarni, A. R., Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., and Rudzinski, W. E. (2000). In-vitro release kinetics of cefadroxil-loaded sodium alginate interpenetrating network beads. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 51, 127-133.
100. Kondolot Solak, E. and Sanli, O. (2010). Use of Sodium Alginate-Poly(vinyl pyrrolidone) Membranes for Pervaporation Separation of Acetone/Water Mixtures. *Separation Science and Technology*, 45(10), 1354-1362.
101. Aprilliza, M. and Aprilliza H. (2017). Characterization and properties of sodium alginate from Brown algae used as an ecofriendly superabsorbent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 188, 1-5.
102. Marti, M., Martinez, V., Carreras, N., Alonso, C., Lis, M. J., Parra, J. L., and Coderch, L. (2014). Textiles with gallic acid microspheres: in vitro Release characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 1-7.
103. Subramanian, A. P., Jaganathan S. K., Mandal, M., Supriyanto, E., and Muhamad, I. I. (2016). Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 22(15), 3952-3961.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DEMİRKAYA, Aslıhan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi : 26.11.1992, Ankara
 Medeni hali : Evli
 E-mail : demirkayaaslihan@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / İleri Teknolojiler A.B.D.	2019
Lisans	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
Lise	Selahattin Akbilek Lisesi	2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017-2019	Karca Medikal	Ürün Sorumlusu

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

- Demirkaya, A. Akgul, S., Kondolot Solak, E., Sagdicoglu Celep, A. G. (2017). Preparation and characterization of microspheres for controlled gallic acid Release. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Afyon, 56.

Hobiler

Yüzme, Pilates



GAZİ GELECEKTİR..