

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELLAJİK ASİTLE YÜKLENMİŞ KİTOSAN KAPLI
ALJİNAT MİKROHİDROJELLERİN
ELEKTROSPREYLEME TEKNİĞİ İLE ÜRETİMİ
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO SİNDİRİM
MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hatice Rumeysa ORDU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Aralık, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELLAJİK ASİTLE YÜKLENMİŞ KİTOSAN KAPLI ALJİNAT
MİKROHİDROJELLERİN ELEKTROSPREYLEME TEKNİĞİ İLE
ÜRETİMİ KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO SİNDİRİM
MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Hatice Rumeysa ORDU tarafından hazırlanan tez çalışması 20.12.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç Dr. Ayşe KARADAĞ, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç Dr. Salih KARASU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Esra ÇAPANOĞLU, Üye

İstanbul Teknik üniversitesi





Danışmanım Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Ellajik Asitle Yüklenmiş Kitosan Kaplı Aljinat Mikro-hidrojellerinin Elektrospreyleme Tekniğı ile Üretimi, Karakterizasyonu ve in vitro Sindirim Modelinde Değerlendirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hatice Rumeysa ORDU

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2020-4113 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem bilimsel çalışmalarındaki teşvik ve yönlendirmeleri için, hem de hayatın her alanındaki engin bilgi ve tecrübeleriyle destekleri için değerli Danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü teknik bilgi ve yardımları ile çalışmalarım boyunca ne zaman, neye ihtiyacım olsa yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili Canan Yağmur KARAKAŞ'a bana kattığı değerler için,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve beni güçlendiren, motive eden kıymetli arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca bana en büyük desteği veren, beni bugünlere ulaştıran sevgili aileme, babam Kahraman ORDU, annem Hülya ORDU ve ablam Gökçe ORDU'ya en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hatice Rumeysa ORDU

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	5
1.3 Hipotez	5
2 KURAMSAL TEMELLER	7
2.1 Fenolik Bileşikler	7
2.2 Ellajik Asit	7
2.2.1 Ellajik Asidin Kimyasal Yapısı ve Fiziksel özellikleri.....	9
2.2.2 Ellajik Asidin Sağlık Üzerine Etkileri	12
2.3 Enkapsülasyon	12
2.4 Enkapsülasyon Yöntemleri	15
2.4.1 Kimyasal Yöntemler	16
2.4.2 Fiziko-kimyasal Yöntemler.....	17
2.4.3 Fiziksel Yöntemler	19
2.5 Kaplama Malzemeleri.....	31
2.5.1 Aljinat.....	33
2.5.2 Pektinler	34
2.5.3 Kitosan	35
3 MATERYAL-METOT	37
3.1 Materyal	37
3.2 Metot	37
3.2.1 Kullanılan Kitosanların Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi	37
3.2.2 Kullanılan Polimerlerin, Besleme Çözeltilerinin Yüzey Yükü (Zeta Potansiyel) ve Viskozite Ölçümleri	38
3.2.3 Ellajik Asit (EA) Yüklü Mikrohidrojellerin Üretimi	39
3.2.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin (%EE) Belirlenmesi	42
3.2.5 Mikrohidrojellerin Parçacık Boyutu Ve Morfolojisi.....	42
3.2.6 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi	43

3.2.7 Mikrohidrojellerin Jel Kuvvetleri	43
3.2.8 Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Koşulları Altında Mikrohidrojellerden EA'nın İn Vitro Salınımı	43
3.2.9 İstatistiksel Analizler.....	44
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	45
4.1 Kitosanları Molekül Ağırlıkları	45
4.2 Kullanılan Polimerlerin, Besleme Çözeltilerinin Yüzey Yükü (Zeta Potansiyel) ve Viskozite Ölçümleri	45
4.3 Mikrohidrojellerin Parçacık Boyutu Ve Morfolojisi	47
4.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin (%EE) Belirlenmesi	55
4.5 Forier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	56
4.6 Mikrohidrojellerin Jel Kuvveti.....	59
4.7 Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Koşulları Altında Mikrohidrojellerden EA'nın İn Vitro Salınımı	60
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKÇA	64
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	73

KISALTMA LİSTESİ

CD	Siklodekstrin
DA	Asetilasyon Derecesi
DE	Esterleşme Derecesi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EA	Ellajik Asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
ET	Ellajitanninler
FTIR	Fouirer Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrofotometre
GIT	Gastro İntestinal Sistem
HC	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan
HHDP	Heksahidroksidifenik asit
HM	Yüksek Metoksilli
LC	Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan
LM	Düşük Metoksilli
NP	Nano Partikül
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SGF	Simüle Mide Sıvısı
SIF	Simüle Bağırsak Sıvısı
SSF	Simüle Tükürük Sıvısı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Diyet ellajitanninler (ET) ve ellajik aside (EA) dönüşümleri	8
Şekil 2.2	Ellajik asit içeren temel gıdalar ve ellajik asidin yapısı	9
Şekil 2.3	Ellajik asidin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.4	Ellajitaninler	10
Şekil 2.5	Bir ellajitanninin hidrolizi ile ellajik asit oluşumu.....	11
Şekil 2.6	Enkapsülasyon işlemi	13
Şekil 2.7	Enkapsülasyonun iki ana formu; çekirdek-kabuk (solda), matriks (sağda)....	14
Şekil 2.8	Lipozomun yapısı	16
Şekil 2.9	Siklodekstrinlerin yapısı.....	17
Şekil 2.10	Koaservasyon ile mikrokapsül hazırlamanın genel aşamaları (1) çekirdek malzeme; (2) polimer; (3) polimer kaplamanın çekirdek malzeme üzerine çökeltilmesi; (4) mikrokapsüller.....	18
Şekil 2.11	Çözücü buharlaştırma yöntemi ile mikroküre üretiminin temel aşamaları ...	19
Şekil 2.12	Püskürterek kurutma aparatının şematik gösterimi	20
Şekil 2.13	Püskürterek soğutma yöntemiyle enkapsülasyon yöntemi.....	21
Şekil 2.14	İyonotropik jelasyon yöntemi ile nano/mikro parçacık üretiminin şematik gösterimi	23
Şekil 2.15	Elektrosprey-iyonotropik jelasyon yoluyla iyonik olarak çapraz bağlı nanoparçacıkların hazırlanmasının şematik diyagramı.....	24
Şekil 2.16	Elektrohidrodinamik proseslerin şeması	25
Şekil 2.17	Elektrohidrodinamik yöntemleri etkileyen faktörler	25
Şekil 2.18	Elektroegirme sisteminin basit şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.19	Çözelti ve işleme parametrelerinin elektroegirmede elde edilen liflerin çapına etkisi	27
Şekil 2.20	Elektropüskürtme yönteminin basit şematik gösterimi	28
Şekil 2.21	Koaksiyel ve emülsiyon elektropüskürtme yöntemleri	30
Şekil 2.22	Sodyum aljinat polimer zincirinin temel kimyasal yapısal birimleri.....	33
Şekil 2.23	Kitosanın temel kimyasal yapısı, deasetillenmiş (kitosan, sağda) ve asetillenmiş (kitin, solda) zincir birimleri.....	35
Şekil 3.1	Mikrohidrojel üretiminin ve çalışmanın grafiksel özeti	39
Şekil 3.2	Elektrodöndürme cihazı	40

Şekil 3.3 Besleme çözeltisinin cihaza yerleştirilmesi.....	40
Şekil 3.4 Banyo çözeltisinin manyetik karıştırıcı ile karıştırılması.....	41
Şekil 3.5 Elektropüskürtme ile üretilmiş banyo çözeltisi içerisindeki mikrohijeller.....	41
Şekil 4.1 Mikrohijel üretimi için kullanılan polisakkarit ve polisakkarit karışımlarını viskozite eğrileri	46
Şekil 4.2 Jelleşme banyosundan toplanan yapıların optik mikroskop görüntüleri. A4, A2 ve A0, sırasıyla 4:6, 2:8, ve 0:10 (a:a) aljinat:pektin oranına sahip formülasyonlardır.....	47
Şekil 4.3 Hijellerin optik mikroskop görüntüleri	49
Şekil 4.4 Ellajik asit içermeyen hijellerin a, b) SEM görüntüleri, c, d, e, f) optik mikroskop görüntüleri.....	52
Şekil 4.5 Hijellerin SEM görüntüleri.	53
Şekil 4.6 Ellajik asit (EA), aljinat, pektin, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan (LC ve HC), A10, A6 hijellerinin (aljinat:pektin oranı sırasıyla 10:0 ve 6:4), ve LC ve HC kaplı A10'un FTIR spektrumları, A10-boş hariç diğer tüm hijeller EA ile yüklenmiştir.....	58
Şekil 4.7 Simüle edilmiş in vitro sindirim koşulları sırasında EA'nın (%) kümülatif çözünmesi.....	61

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Enkapsülasyonda kullanılan kaplama malzemeleri	32
Tablo 4.1 Viskozite, zeta potansiyeli ve çalışmada kullanılan polimerlerin ortalama molekül ağırlığı değerleri.....	45
Tablo 4.2 Hidrojellerin partikül boyutu, enkapsülasyon etkinliği ve jel kuvveti.....	48



Ellajik Asitle Yüklenmiş Kitosan Kaplı Aljinat Mikrohidrojellerin Elektrospreyleme Tekniğı ile Üretimi Karakterizasyonu ve in vitro Sindirim Modelinde Değerlendirilmesi

Hatice Rumeysa ORDU

Gıda Mühendisliğı Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ayşe KARADAĞ

Güçlü bir diyet antioksidanı olan ellajik asit (EA), mide ve ince bağırsakta hızlı emilimi nedeniyle sınırlı biyoyararlanıma sahiptir ve EA, kolonda daha biyoyararlı bileşiklere (ürolitinlere) dönüştürülür. Gastrointestinal sistemde EA salımını uzatan ve kolona daha fazla EA ileten bir kapsülleme sistemi, EA'nın oral biyoyararlanımını iyileştirebilir. Bu çalışmada, elektropüskürtülmüş EA yüklü aljinat-pektin tanecikleri üretilmiş ve düşük (LC) ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan (HC) ile kaplanmıştır. Simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında kaplanmamış ve kaplanmış hidrojel mikropartiküllerden EA salımı değerlendirilmiştir. Numuneler, partikül boyutu, jel kuvveti, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Fourier transform kızılötesi (FTIR) analizi ile karakterize edilmiştir. EA'nın kapsülleme verimliliğı (% EE), kaplanmamış mikropartiküller için %49.53 ile %69.85 arasında değişmiştir, bu, kaplama ile %86.50'ye yükseltilmiştir ve LC ile kaplama, daha yüksek %EE sağlamıştır. Aljinata pektin ilavesi ve kitosan kaplama, kitosanın moleküler ağırlığına bağılı olarak jel kuvvetini azaltmış ve boyutunu değiştirmiştir. Pektin eklenmiş mikropartiküllerin SEM görüntüleri daha az çatlak, ancak daha fazla kırışıklık göstermiştir ve kitosan kaplama daha fazla kümelenmiş yüzeyler göstermiştir. Aljinat-pektin-kitosan'ın

iyonik etkileşimi ve EA'nın tutulması FTIR ile doğrulanmıştır. Gastrik ortamda, kaplanmamış mikropartiküllerden EA salınımı çok düşük (%15.2-19.8) olmuş ve kitosan kaplama ile tamamen kısıtlanmıştır. Bağırsak aşamasında, LC kaplı aljinat-pektin mikropartiküllerinden EA salımı sadece %18'dir ve kaplanmamış veya HC kaplı muadilleri için bu oran %55 ile %65 arasında olmuştur. LC kaplı aljinat-pektin mikropartikülleri, kolon hedefli EA dağıtımı için potansiyel bir sistem olarak daha fazla araştırılabilir.

Anahtar Kelimeler: Ellajik asit, elektrosprey, aljinat, kitosan, enkapsülasyon.



The Production Of Ellagic Acid Loaded Chitosan-Coated Alginate Micro-Hydrogels By Electrospraying Technique: Characterization And Evaluation By In Vitro Digestion Model

Hatice Rumeysa ORDU

Department of Food Engineering
Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Ayşe KARADAĞ

Ellagic acid (EA), a potent dietary antioxidant, has limited bioavailability owing to its rapid absorption in the stomach and small intestine, and EA is transformed to more bioavailable compounds – urolithins – in the colon. An encapsulation system that sustains the release of EA in the gastrointestinal system and delivers more EA into the colon could improve the oral bioavailability of EA. Electrosprayed EA-loaded alginate–pectin beads were produced and coated with low- (LC) and highmolecular-weight chitosan (HC). The EA release from uncoated and coated beads under simulated gastrointestinal conditions was evaluated. The samples were characterized by particle size, gel strength, scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR) analysis. The encapsulation efficiency (EE%) of EA ranged from 49.53% to 69.85% for uncoated beads, which was elevated up to 86.50% by coating, and LC coating provided higher EE%. Pectin addition to alginate and chitosan coating reduced the gel strength and changed the size depending on the molecular weight of chitosan. SEM images of pectin-added beads showed fewer cracks but more wrinkles, and chitosan coating presented more aggregated surfaces. The ionic interaction of alginate–pectin–chitosan and the entrapment of EA were confirmed by FTIR. In the gastric medium, EA release was very

low from uncoated beads (15.2–19.8%), and totally restricted by chitosan coating. In the intestinal stage, EA release from LC-coated alginate–pectin beads was only 18%, and it was between 55% and 65% for uncoated or HC-coated counterparts. The LC-coated alginate–pectin beads could be further explored as a potential system for colon-targeted delivery of EA.

Keywords: Ellagic acid, electrospray, alginat, chitosan, encapsulation.



1.1 Literatür Özeti

Ellajik asit ahududu, nar, kıvılcık, çilek gibi taneli küçük meyveler (berries), kestane ve cevizde zengin miktarda bulunan fenolik bir bileşendir. Serbest formunda veya çok daha yaygın olarak hidrolize edilebilir tanenlerin, özellikle ellagitanninlerin bir parçalanma ürünü olarak ortaya çıkabilir. Ellajik asitin antikanserojen, diyabetik komplikasyonları azaltma ve ateroskleroz gibi çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Bununla birlikte, ellajik asit, fizyolojik pH'ta zayıf çözünürlük, geçirgenlik ve stabilite gösterir ve bu durum tedavi ve hastalık riskini azaltma amaçlı uygulamaları açısından kullanım potansiyelini sınırlar [1]. Bu kısıtlamanın azaltılması amacıyla, ellajik asitin polimerik yapılar içerisine enkapsüle edilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur [2, 3].

Aljinat, esas olarak kahverengi deniz yosunlarından elde edilen anyonik bir doğal polisakkarittir. Biyouyumluluğu ve düşük toksisitesi nedeniyle genellikle gıda, farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için ilk tercih edilen polisakkaritlerin başına gelir [4]. Aljinatın kolay sol-jel geçişi göz önüne alındığında, vitaminler ve probiyotikler, immobilizasyon ve doku mühendisliği gibi fonksiyonel bileşenlerin mikrokapsüllemesi için en yaygın olarak kullanılan biyopolimerlerden biridir. Aljinat jelleşmesi, Ca^{+} iyonlarının kendi polimer zincirinde bulunan karboksilik gruplara bağlanmasıyla oluşur ve egg-box yapıları oluşur [5]. Ancak, yapılan çalışmalarda aljinat mikropartikülleriyle düşük molekül ağırlıklı bileşikler enkapsüle edildiğinde, enkapsülasyon etkinliğinin düşük olduğu ve enkapsüle edilen maddeyi hızla saldığı gözlenmiştir. Bu durum oluşan partiküllerin yüzeyinin gözenekli bir yapıda olması ve bu gözeneklerin büyüklüğü ile ilişkilidir [4]. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için yapılan bazı çalışmalarda, aljinat mikropartiküllerinin yapısı, kitosan, pektin, metilselüloz ve dekstran sülfat gibi çeşitli polimer ve polisakkaritler ile birlikte kullanılarak güçlendirilmiştir [6].

Kitosan, glukozamin ve N-asetilglukozamin birimlerinden oluşan doğal bir polisakkarittir ve düşük pH değerlerinde polikasyon özellik gösterir. Kitosanın bu özelliği, negatif yüklü aljinatla güçlü şekilde etkileşime girmesini sağlar [7]. Zayıf asidik ve nötr pH'larda Ca^{+}

alginat partiküllerinin zeta potansiyelinin negatif değerlere sahiptir. Bu nedenle, üretilen Ca-aljinat mikrohijrojelieri, kitosan çözeltilisi ile işlem gördükten sonra, aljinatın karboksilik grupları ile kitosanın amin grupları arasındaki elektrostatiik etkileşimlerin sonucu olarak partiküllerin etrafında bir zar oluşur [8]. Bununla birlikte, kaplamanın etkinliğı ve çapraz bağ yoğunluğı, kitosanın moleküler ağırlığa göre büyük ölçüde değışir. Bunun ağı mukavemetini ve dolayısıyla partiküllerin kapsüllenmiş maddeyi jel matrisi içinde tutma kabiliyetini önemli ölçüde etkilediğı varsayılmaktadır. Aljinat-kitosan mikro / nanopartiküller, çeşitli biyoaktif bileşiklerin enkapsüle edilmesi ve kontrollü salımı için kullanılmıştır, bunlar arasında sığır serum albümini [9] gibi yüksek moleküler ağırlıklı bileşenlerin yanı sıra, ampisilin [10] gibi düşük moleköl ağırlıklı maddeler sayılabilir.

Ca-aljinat hijrojellerinin üretilmesinde en çok kullanılan ve bilinen tekniklerden birisi aljnat çözeltilisinin çapraz bağlayıcı banyoya belirli bir akış hızında damlatılmasını içeren iyonotropik jelasyon tekniğıdir. [11-16]

Elektrosprey, yüzey geriliminden daha güçlü elektrostatiik kuvvetler uygulayarak sıvı veya polimerik bir çözeltiliyi atomize etme yöntemidir [17]. Bu işlemde, kılcal bir nozölün ucundaki bir sıvı damlacığı, yüksek bir elektrik alanına maruz kaldığında, dahili elektrostatiik itmeler ve sonradan parçalanan bir jetin yayıldığı harici çekici kolombiik kuvvetleri nedeniyle şekil deformasyonuna uğrar ve ince damlacıklara [18] dönüşür.

Sansone ve ark. (2011) protein, dekstran ve maya hücrelerinin elektrospreyleme tekniğı ile enkapsüle edildiğinde yüksek enkapsülasyon etkinliğı ve stabilite değerleri gözlemlemişlerdir [19]. Rassoul Kadakhodae ve ark.(2018), yaptıkları çalışmada enkapsüle edilen maddenin (kafeinin) salınım hızını yavaşlatmak için elektrosprey yöntemiyle üretilen aljinat mikrohijrojellerini düşük ve yüksek moleköl ağırlıklı kitosanlarla kaplamıştır. Aljinat ve kitosan arasındaki elektrostatiik etkileşim (özellikle düşük moleküler ağırlıklı kitosan varlığında), kafein salınımına karşı etkili bir bariyer sağlamış ve kitosanla kaplanmayan kontrol numunelerine kıyasla partiküllerin şişmesini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, kitosan ile kaplanmış Ca-aljinat mikrohijrojellerin düşük moleküler bileşiklerin kapsüllenmesi için kullanılabileceğini göstermiştir. Ek olarak, doğal polimerlerden monodispers (homojen boyut dağılımı) gösteren partiküllerin üretiminde elektrosprey alternatif bir yöntem olarak gösterilmiştir [20].

Yu Fukui ve ark. (2010) çalışmalarında, polielektrolit mikrokapsüllerin elektrosprey ile hazırlanmasını incelenmişlerdir. Homojen boyut dağılımı gösteren aljinat / kitosan mikrokapsülleri ($\sim 100 \mu\text{m}$) bu teknikle başarıyla üretilmiştir. Besleme hızı, çalışma voltajı, iğneden toplayıcıya olan mesafe, iğne çapı ve polielektrolit konsantrasyonları gibi çalışma koşulları değiştirilmiş, polielektrolit mikrokapsüller içinde protein, dekstran ve polimerik mikrokürenin yüksek enkapsülasyon verimliliğiyle (% 99'dan fazla) enkapsüle edilmiştir [21]. Fatma M Mady ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, ellajik asidin (EA), oral uygulamadan sonra biyoaktivitesini ve biyoyararlanımını artırmanın bir yolunu bulmak için, biyolojik olarak parçalanabilir polimer olarak Poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) kullanılıp, emülsiyon-difüzyon-buharlaştırma tekniği ile EA-NP'ler üretilmiştir. Elde edilen NP'ler, parçacık boyutu, zeta potansiyeli, Fourier dönüşüm kızılötesi, diferansiyel tarama kalorimetrisi ve X-ışını kırınımı ölçülerek karakterize edilmiştir. EA'nın kapsüllenme etkinliği ve salınım profili de belirlenmiştir. Elde edilen NP'lerin *in vitro* hücresel alımı ve sitotoksitesi, sırasıyla Caco-2 ve HCT-116 kanser hücre hatları kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, Yeni Zelanda beyaz tavşanları kullanılarak, EA-NP'lerin oral biyoyararlanımını serbest EA'ya kıyasla ölçmek için *in vivo* çalışma yapılmıştır. Yüksek yükleme verimliliğine sahip NP'ler üretilmiş, EA-NP'lerden EA'nın difüzyon ile kontrollü bir şekilde salındığı belirlenmiştir. EA-NP ile muamele edilmiş HCT-116 kanser hücreleri, serbest EA ile muamele edilmiş hücrelere kıyasla nispeten daha düşük hücre canlılığı göstermiştir. Florometrik görüntüleme, Caco-2 hücrelerinin nükleer bölgesinde EA-NP'lerin hücresel alımını ve verimli lokalizasyonunu ortaya çıkarmıştır. *In vivo* testler, EA-NP'lerin oral uygulamasının serbest EA'ninkine kıyasla daha verimli olduğunu göstermiştir. Serbest EA, kanda 12 saate kadar gözlemlenirken maksimum konsantrasyona ise ağızla alınmasından 0.65 saat sonra ulaşmıştır, aynı miktarda EA içeren NP uygulaması sonrası ise, 48 saat boyunca kanda EA tespit edilmiş ve maksimum konsantrasyona 6 saat sonunda ulaşılmıştır (yavaşlatılmış ve kontrollü salınım). AUC (eğri altındaki alan) değerleri karşılaştırıldığında EA'nın NP formunda, serbest olana göre biyoyararlılığının 3.6 kat arttığı belirtilmiştir [22].

Arulmozhi V. ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, ağız kanseri tedavisi için etkili bir ilaç taşıma sistemi olarak, ellajik asit yüklenen kitosan nanopartikülleri (EA-CS-NP) iyonik jelasyon yöntemi ile üretilmiştir. Üretilen ellajik asit nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutları 176 nm olmuştur. Nanopartiküllerin ellajik asiti enkapsülasyon ve yükleme etkinliği sırasıyla $\% 94 \pm 1.03$ ve $\% 33 \pm 2.15$ olmuştur. PBS ortamındaki *in vitro* ellajik asit salım profili incelendiği zaman, EA-CS-NP'den ani salım

yerine sürekli şekilde yavaşlatılmış salınım gösterdiği belirtilmiştir [23]. D. Venkat Ratnam ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ise, ellajik asit ve koenzim Q10'in, biyoyararlanımlarını iyileştirme ve terapötik (tedavi amaçlı) etki için gerekli dozun azaltılması amacıyla birlikte kapsüllenecek nanopartikülleri üretilmiş ve yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda hiperlipidemiği iyileştirmede olası sinerjizmin etkisi incelenmiştir. Ellajik asit ve koenzim Q10'in birlikte kapsüllendiği partiküllerin boyutu 260 nm olarak ölçülmüştür. Oral süspansiyonda serbest halde ve nanopartiküller olarak enkapsüle edilen kombinasyonu verildiği zaman, tedaviden 2 hafta sonra sıçanların hiperlipidemik koşullarının iyileştiği gözlemlenmiş ve nanopartiküllerin, serbest forma göre daha uzun süre kolesterol düşürücü etkiyi sürdürdüğü, glikoz ve trigliseridleri düşürmede ve endotel işlevini iyileştirmede 3 kat daha düşük dozda dahi etkili olduğu bulunmuş ve böylece, nanopartikül yapı içerisine enkapsüle edildikleri zaman bu iki antioksidan maddenin etkinliğini arttırıldığı gösterilmiştir [24].

Literatürde elektrospreyleme ve iyonik jelasyon tekniğinin bir arada kullanımı ile partikül üretimi, nane yağının [25], çörek otu yağının [26], biyoaktif polisakkarit [27], parasetamol [28], kafein [20], kök hücre [29], adenovirüs [30] gibi çeşitli bileşiklerin enkapsülasyonunda uygulanmıştır. Fenolik bileşenlerin, ayrı ayrı iyonik jelasyon yöntemi ve elektrospreyleme tekniği ile enkapsülasyonu hakkında çok fazla çalışma bulunmaktadır, ancak bu iki tekniğin bir arada kullanıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır, ellajik asit enkapsülasyonunda ise daha önce kullanılmamıştır.

Alijnat bazlı mikropartiküllerin başlıca dezavantajı düşük enkapsülasyon etkinliği, üretilen partiküllerin homojen olmayan boyut dağılımı göstermesi, enkapsüle ettikleri maddeyi hızla salmalarındır. Projemizde önerilen yöntemde, mikropartikül üretmek için elektrospreyleme tekniği ve iyonik jelasyon teknikleri bir arada kullanılacaktır. Besleme çözeltisinde aljinate ve pektin biyopolimerleri karışımı ile aktif madde (ellajik asit) homojen bir şekilde karıştırılacaktır. Daha sonra iyonik açıdan yüklü olan bu çözelti, kılcal bir açıklıktan yüksek elektrik alanına maruz bırakılacaktır ve çözelti jeti ince damlacıklara dönüştürülecektir. Besleme çözeltisinin altında bulunan banyoda çapraz bağlama ajanı (CaCl_2 çözeltisi) ve farklı molekül ağırlıklarında karşıt yüke sahip polimer (kitosan) çözündürülmüştür. Bu şekilde (1) daha homojen boyut dağılımına sahip partikül üretimi (2) aktif maddenin yüksek enkapsülasyon verimi (3) enkapsüle edilen maddenin simüle sindirim sisteminde yavaş salınımı (özellikle serbest ellajike göre bağırsak ortamında ellajik asitin korunması) sağlanacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı; kalsiyum aljinat (Ca-aljinat) mikro-hidrojellerinin matriksini; (i) pektinle güçlendirilerek ve (ii) hidrojelleri kitosanla kaplayarak aljinat hidrojellerinde görülen gözenekli yapının tıkanması ve böylelikle ellajik asitin salımının geciktirilmesi ve hidrojel stabilitesinin arttırılmasıdır. Bu doğrultuda, ellajik asitin biyoaktif özelliğine zarar vermeyecek üretim koşullarında elektrospreyleme ve iyonotropik jelasyon yöntemi birleştirilerek, ellajik asit yüklü Ca-aljinat mikro-hidrojellerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Çalışmada üretilen mikrohidrojellerin ortalama partikül boyutu, ellajik asit enkapsüle etme etkinliği belirlenmiştir, üretilen yapıların SEM görüntüleri ile morfolojileri, FTIR spektrumları alınarak fiziksel bağlanmaları, tekstür analizi ile jel kuvvetleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, simüle edilmiş ağız, mide ve bağırsak ortamına maruz bırakılan farklı mikrohidrojellerden (pektin içeriği, kitosan molekül ağırlığı) ellajik asit salım profilleri incelenmiştir.

1.3 Hipotez

Elektrospreyleme tekniği, yüksek basınç, sıcaklık gibi fenoliklerin aktivite kaybına sebep olabilecek koşullara sahip olmaması, basit ve uygulanabilir bir teknik oluşu dolayısıyla son yıllarda öne çıkan bir enkapsülasyon tekniğidir. İyonik jelasyon tekniğinde ise kullanılan polimerlerin özellikleri (suda çözünürlükleri, molekül ağırlıkları, yüzey yükleri, birbirleri ve kullanılan bağlayıcı ile olan interaksiyonları) ile aktif bileşenin enkapsüle edildiği sistemin modifiye edilmesi, stabilitesinin arttırılması mümkündür. Ayrıca, herhangi bir organik çözücü kullanmaksızın suda çözünen doğal biyopolimer ile çalışılmasına da imkân tanımaktadır. Bu çalışmada bu iki teknik bir arada kullanılarak ellajik asitin aljinat ve pektin biyopolimerleri ile mikrohidrojel yapılar içerisine enkapsüle edilmesi sağlanacaktır.

Ellajik asit, yüksek erime sıcaklığına ve yüksek kristallığe sahip, suda çok az çözünen ($9.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) bir bileşiktir. Her ne kadar çözünürlüğü artan pH ile artsa da, yüksek pH değerlerinde fenolik bileşiklerin stabilite sorunları olduğunu ve oksidasyona uğrayarak yapılarının bozulduğu bilinmektedir. Yapılmış birçok çalışma, ellajik asitin antioksidan, antikanserojen, antidiyabetik, antiviral ve anti-inflamatuar etkileri olduğunu göstermiştir. Ancak ellajik asidin düşük su çözünürlüğü ve hızla metabolize olması nedeniyle bu etkilerin, ellajik asit içeren takviyelerle ilgili klinik çalışmalarda bu sonuçlara ulaşılması ve yorumlanması zorlaşmaktadır. Ellajik asitin sindirim yoluyla alındığı zaman düşük

biyoyararlılığa sahip olduğu, kandaki yarılanma süresinin çok kısa olduğu ve hızla metabolize edildiği bilinmektedir. Ellajik asit, hızla mideden ve ince bağırsağın üst kısmından absorbe edilmektedir. Örneğin sindirim sonrası, kandaki EA miktarı hızla azalmakta ve 30-60 dak içerisinde 30 ng/mL düzeyine düşmektedir. EA ile zengin gıdalarla beslenildiği zaman dahi kandaki miktarın istenen sağlık etkilerine sebep olacak düzeye gelemediği bildirilmiştir. EA ile beslenme sonrası adı geçen sağlık etkilerinin EA dan ziyade kalın bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilmesi sonrası oluşan ve EA'dan 25-80 kat daha fazla biyoyararlanılabilir olan urolitinler ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Yine yapılan çalışmalar sindirim yoluyla daha fazla alınan EA'nın kandaki serbest EA miktarını arttırmadığı ama urolitin miktarını arttırdığını göstermiştir.

Dolayısıyla, bu çalışmanın hipotezi, sindirim-ağız yoluyla alınan EA'in mide ve bağırsak sindirim ortamında salımını kısıtlayacak, uzatılmış ve yavaş salımını sağlayacak ve dolayısıyla kalın bağırsağa geçirilecek EA miktarını arttırma potansiyeline sahip bir enkapsülasyon sistemi geliştirmektir.

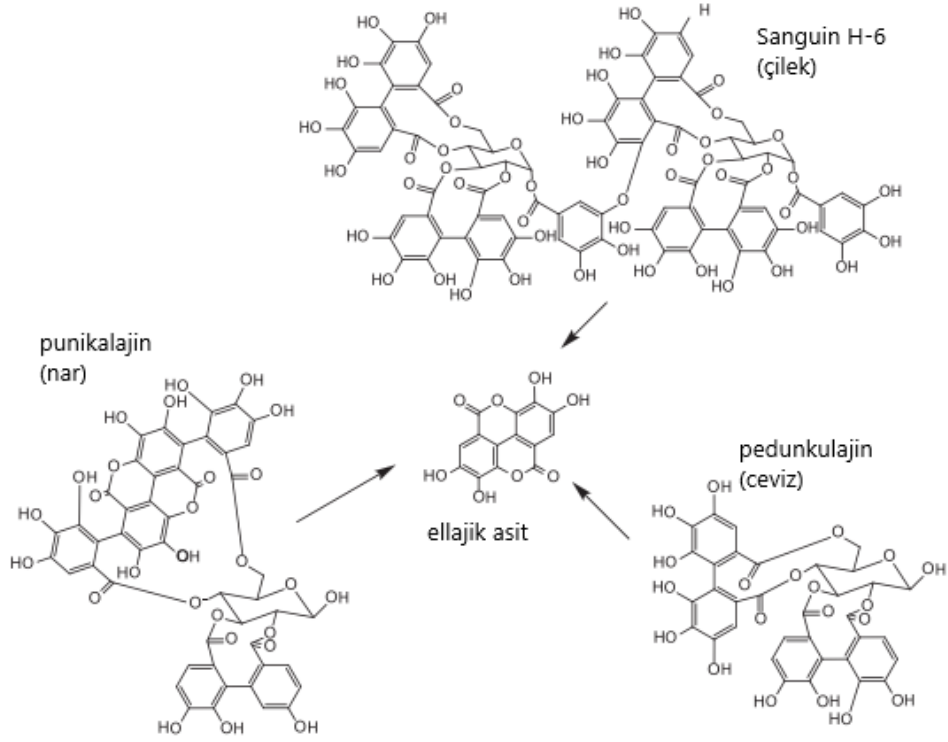
2.1 Fenolik Bileşikler

Son zamanlarda insan sağlığına faydalı ürünlere olan ilgi artmaktadır. Meyve ve sebze tüketiminin insan sağlığını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Meyve ve sebzelerin çeşitli hastalıklar üzerindeki bu olumlu rolü, içerdikleri fenolik bileşikleriyle yakından ilişkilidir. Fenolik bileşikler, bitkilerde doğal olarak bulunan, antioksidan özellik gösteren biyoaktif bileşenlerdir [41,42]. Fenolik bileşikler yapısı, bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik bir halkadan oluşur. Yapısal olarak değişik özelliklere sahip 8000'den fazla bitkisel fenolik bileşik vardır. Bu bileşikler, flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirler. Fenolik bileşikler, basit fenoller, kumarinler, ligninler, lignanlar, yoğunlaştırılmış ve hidrolize edilebilir tanenler, fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşur. Hidrolize edilebilir tanen sınıfına ait olan ellajitanninler, ellajik asidin (EA) kompleks türevleridir. Hidroliz edildiklerinde ellajik asit ortaya çıkar [42,43].

2.2 Ellajik Asit

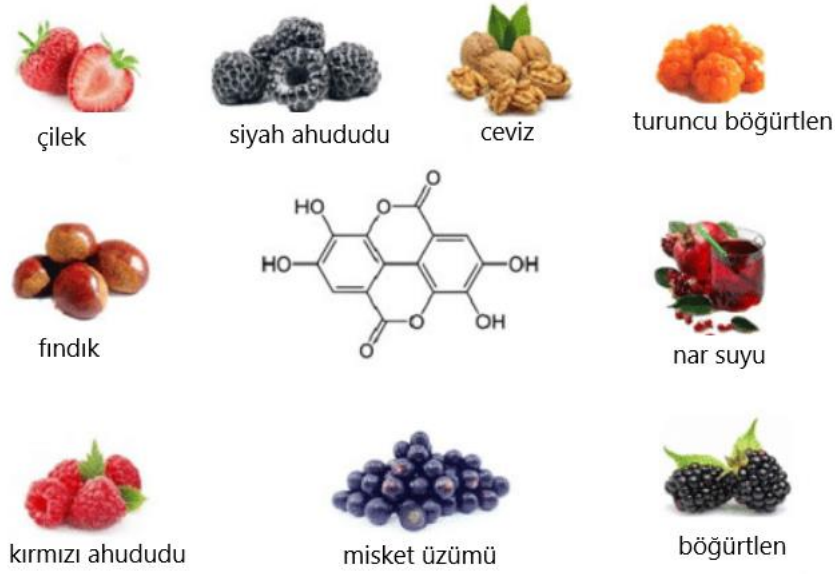
Ellajik asit ($C_{14}H_6O_8$), insan sağlığı için besleyici ve tedavi edici özellikleri olan, doğal bitkisel bir fenolik bileşiktir [31,34,36,46]. Kimyager Henri Braconnot tarafından keşfedilmiştir [44]. Antioksidan özellik gösterir ve bir çok hastalık için tedavi edici özelliği vardır [31,34,36,44,46]. Bitkilerde, serbest formda veya ellajitanninler olarak bulunabilirler [31,34,46]. Ellajitanninler, pH ve bağırsak mikrobiyotasının etkisiyle hidrolize edilebilen, ve ellajik aside dönüşen kompleks bileşiklerdir [31,34,44,46].

Ellajitanninlerin asitler veya bazlar ile hidrolizi, heksahidroksidifenik asit (HHDP) bileşiğini verir [32,37]. Bu bileşikler spontan olarak ellajik aside laktonize olurlar (Şekil 2.1) [37]. Hem ET'ler hem de EA, sıçanlar, domuzlar ve insanlar dahil olmak üzere farklı memelilerin kolon mikrobiyotası tarafından büyük ölçüde metabolize edilir [37].



Şekil 2.1 Diyet ellajitanninler (ET) ve ellajik aside (EA) dönüşümleri [32]

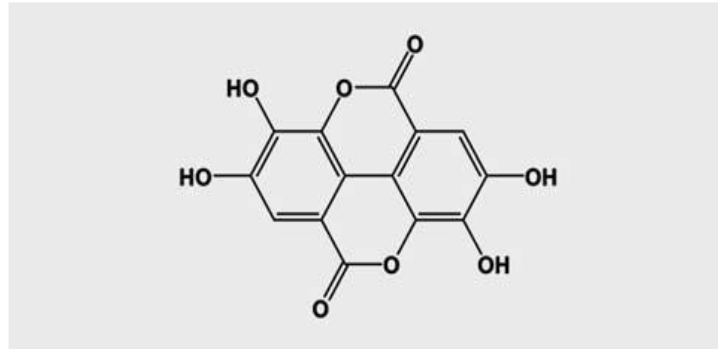
Ellajik asit, bir çok meyvede değişen konsantrasyonlarda bulunabilir (Şekil 2.2) [32,37]. Ahududu, en yüksek konsantrasyonu içeren meyvelerdendir ve 1900 mg/100 g (sarı ahududu) ile 270 mg/100 g (yabani ahududu) arasında değişen oranlarda (taze ağırlığa göre ifade edilir) ellajik asit içerdiği bilinmektedir [31]. Ellajitaninler ve ellajik asit ayrıca çilek, kırmızı ve siyah ahududu, böğürtlen, ceviz, antep fıstığı, kaju fıstığı, kestane, meşe palamudu ve pikan cevizleri, narlar ve misket üzümleri gibi meyvelerde de bol miktarda bulunurlar [31,32,45]. Ahşabın, özellikle meşe ağacının önemli bileşenleridir. Ellajitanninler, farklı yaşlanma süreçleri sırasında ahşaptan gıda matrisine göç ederek şarap ve viski gibi çeşitli gıda ürünlerine geçebilirler. Ellajik asit ayrıca çeşitli bal türlerinde de bulunmuştur ve funda balı için çiçek belirteci olarak sunulmuştur [32].



Şekil 2.2 Ellajik asit içeren temel gıdalar ve ellajik asidin yapısı[45]

2.2.1 Ellajik Asidin Kimyasal Yapısı ve Fiziksel özellikleri

Ellajik asit (Şekil 2.3) dört hidroksil grubu ve iki laktonlu hidrofilik bir parçaya ve iki hidrokarbon halkalı bir lipofilik parçaya sahip olan bir kromen-dion türevidir (2,3,7,8-tetrahidroksi-kromeno[5,4,3-cde]kromen-5,10-dion; $C_{14}H_6O_8$; ma: 302.194 g/mol) [31].

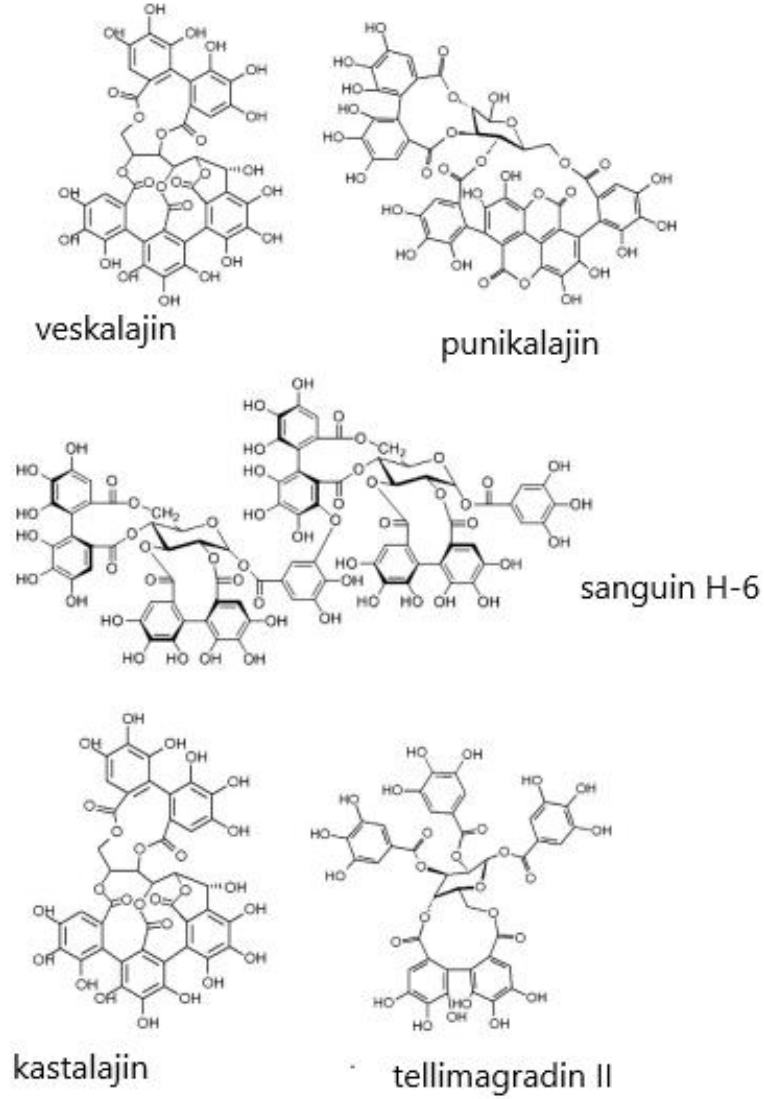


Şekil 2.3 Ellajik asidin kimyasal yapısı [31]

Ellajik asit (EA) başka bir ifadeyle, iki gallik asit motifinin iki aril halkasını birleştirmek için bir karbon-karbon bağı yoluyla oksidatif olarak bağlandığı bir biaril polifenoldür [35,45].

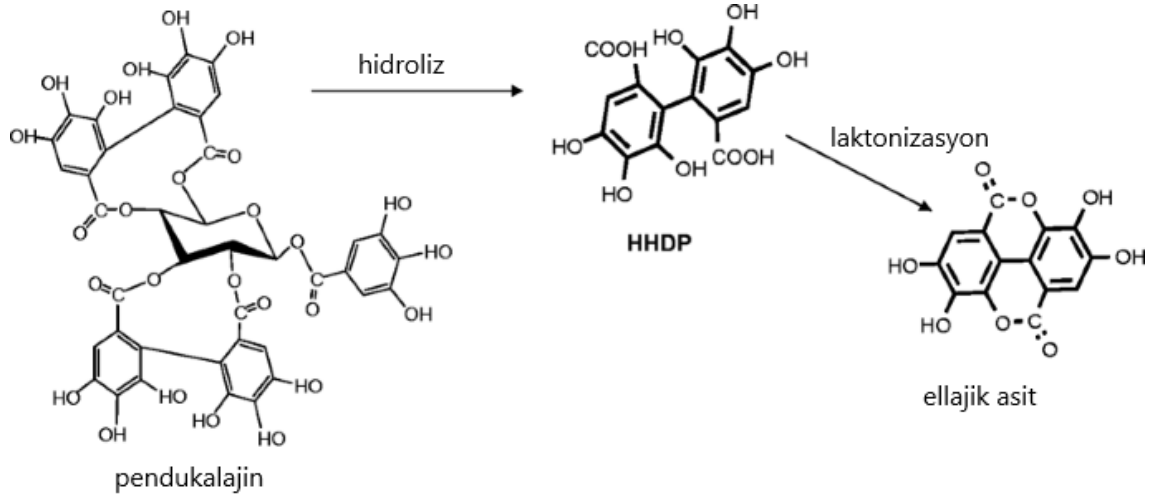
Pek çok tanen, sıcak su, asitler, bazlar veya tanazlarla muamele yoluyla hidrolitik olarak bileşenlerine ayrılabilir, bu tür tanenler "hidrolize edilebilir tanenler" olarak sınıflandırılır. Hidrolize edilemeyen oligomerik ve polimerik proantosiyanidinler, yoğunlaştırılmış tanenler olarak sınıflandırılır. Hidrolize edilebilir tanenler terimi, hem

gallotaninleri hem de ellajitanninleri içerir. Ayrıca, polifenolik kalıntıların poliol birimi ile ek bir C-C eşleşmesi nedeniyle hidrolize edilemeyen, ancak yine de tarihsel nedenlerle hidrolize edilebilir tanenler olarak sınıflandırılan ellajitanninler (Şekil 2.4) de bulunmaktadır [37].



Şekil 2.4 Ellajitanninler

Ellajitanninler, Şekil 2.5'te görüldüğü üzere, hidroliz sonucunda, heksahidroksidifenik asit (HHDP) oluştururlar ve bu bileşik kendiliğinden laktonizasyon ile ellajik aside dönüşür [40].



Şekil 2.5 Bir ellajitanninin hidrolizi ile ellajik asit oluşumu

Ellajik asit, krem renkli veya sarı toz şeklinde görünür, kokusuzdur [48]. Ellajik asit, hem dört hidroksil ve iki lakton grubundan oluşan bir hidrofilik parçayı hem de iki hidrokarbon fenil halkasından oluşan bir lipofilik parçayı içerir [48]. Ellajik asit, düzlemsel ve simetrik yapısından ve kristaller içinde oluşabilen geniş hidrojen bağı açısından kaynaklanan yüksek derecede kristallik ile donatılmıştır. Bu özellikleri, asidin hem sulu hem de organik çözücüler içinde az çözünür olmasına neden olur [48]. EA, pH 7.4 ve 21°C'de yaklaşık 9.3-9.7 µg/mL'lik önemsiz bir suda çözünürlüğe ve alkolde çok zayıf bir çözünürlüğe sahiptir, bu da çok zayıf bir biyoyararlanım ve gastrointestinal kanalda (GIT) önemsiz absorpsiyona sebep olur. EA'nın suda çözünürlüğü, pH ile artar [48]. Plazmadaki düşük serbest ellajik asit konsantrasyonlarının sebebinin sudaki düşük çözünürlük ile ilişkili olduğu ve ayrıca absorpsiyondan önceki metabolik transformasyonu ve bozulmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir [39]. Bunlara ek olarak, ellajik asitin hücresel DNA ve proteinlere geri dönüşümsüz olarak bağlanarak, sınırlı transselüler absorpsiyona neden olabileceği düşünülmektedir [38,39,44]. Yanı sıra, bağırsak mikroflorasının çözünmeyen ellajik asidi metabolize ettiği de öne sürülmektedir [39]. Bu metabolizmanın, ellajik asitten daha suda çözünür ve biyolojik olarak kullanılabilir olan ürolitinler adı verilen biyoaktif metabolitlerin oluşmasını sağladığı gösterilmiştir [47].

Ellajik asidin erime noktası 450°C ve kaynama noktası 796.5°C dir. Yüksek derecede termostabil bir moleküldür. Midedeki fizyolojik koşullar altında nispeten stabildir, bu da onu gıdaların, nutrasötiklerin ve ağızdan alınacak ilaçların geliştirilmesi için ilginç bir fitokimyasal aday yapar [47].

2.2.2 Ellajik Asidin Sağlık Üzerine Etkileri

Ellajik asit gibi fenolik fitokimyasallar, meyve ve sebzelerin önemli bileşenleridir ve antioksidan özelliklerinden dolayı oksidasyona bağlı kronik hastalıklara karşı yararlı sağlık etkileri gösterirler [33,34]. Ellajik asit ve türevleri, antioksidan özelliklerinin yanı sıra, antiinflamatuvar, antiglikatif, östrojenik ve/veya antiöstrojenik, antimikrobiyal ve ayrıca insan sağlığına katkıda bulunabilecek prebiyotik aktiviteler olmak üzere çok çeşitli biyolojik ve fizyolojik özellik gösterirler [33,47,48,34]. Ellajik asit ve ellajitannin açısından zengin gıdaların, kronik hastalıkların önlemesinin yanında kanser, diyabet ve diyabetik komplikasyonlar, kronik doku iltihabı, metabolik sendrom, obezite aracılı metabolik komplikasyonlar, kardiyovasküler, gastrointestinal, böbrek, karaciğer ve göz hastalıkları, depresyon, Alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalıklara karşı olumlu yönde etkileri bulunmaktadır [47]. Ellajik asit ayrıca metabolik sendromun gelişimine ve bazı mikrobiyal, viral ve paraziter hastalıklara veya enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabilir [47,48].

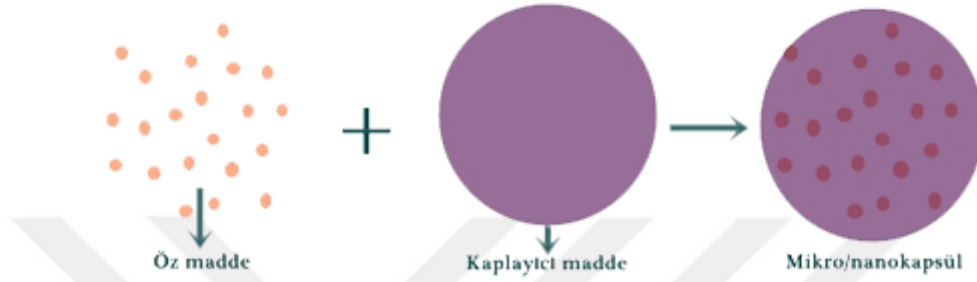
Ellajik asit, hidroksil grupları ve lakton sistemleri hidrojen bağlarına ev sahipliği yapar, ancak elektron alıcıları ve hidrojen vericileri olarak da işlev görebilirler. Böylece antioksidan özellik gösterirler. Yukarıda bahsedilen faydalarının çoğu da bu antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır [48].

2.3 Enkapsülasyon

Son yıllarda, sağlıklı yaşama duyulan ilgi artmaktadır. Tüketiciler, kronik hastalıkları önlemek, fiziksel ve zihinsel sağlıklarını iyileştirmek için daha bilinçli hale geliyor ve yaşam tarzlarına ve sağlıklı beslenmeye daha fazla dikkat ediyor [54]. Bu durumdan dolayı, nutrasötik ve fonksiyonel gıda endüstrileri, vitaminler, mineraller, proteinler, lipidler, antioksidanlar, fitokimyasallar ve probiyotikler gibi biyoaktif bileşenler içeren gıda matrisleri geliştirmeye odaklanmaktadır [54,55]. Bununla birlikte, biyoaktif bileşenler proses ve çevre koşullarına duyarlıdır, gıda hazırlama ve saklama sırasında zayıf stabilite gösterir ve üst gastrointestinal sistem (GI) koşullarına maruz kaldığında düşük biyoyararlanım gösterirler [54,55]. Bu nedenle, biyoaktiviteyi sürdürmek, biyoaktif bileşiklerin kontrollü salınımını sağlamak ve biyoyararlanımı iyileştirmek için etkili kapsülleme ve dağıtım yöntemleri kullanmak önemli bir çözümdür [54,55].

Enkapsülasyon, bir maddeyi (aktif madde) başka bir madde (duvar malzemesi) içine hapsetme işlemi (Şekil 2.6) olarak tanımlanabilir ve biyoaktif moleküllerin ve canlı

hücrelerin gıdalara ilave edilmesini iyileştirmek için yararlı bir araçtır [51,52]. Kapsüllenmiş madde, saf bir madde ya da bir karışım olabilir ve çekirdek, dolgu, aktif, dahili malzeme veya faydalı yük fazı olarak adlandırılabilir. Kapsülleyen maddeye genellikle kaplama materyali, zar, kabuk, kapsül, taşıyıcı malzeme, dış faz veya matris denir [50,51,52]. Taşıyıcı ya da kabuk madde, şeker gumlarından, proteinler, doğal veya modifiye polisakkaritler, lipitler ve sentetik polimerlerden yapılmış olabilir [50].



Şekil 2.6 Enkapsülasyon işlemi

Aktif farmasötik bileşenler, proteinler, peptitler, uçucu yağlar, gıda malzemeleri, pigmentler, boyalar, monomerler, katalizörler, pestisitler vb. gibi farklı malzeme türleri, etilselüloz, hidroksil propilmetil selüloz, sodyum karboksi metil selüloz, sodyum aljinat, PLGA, jelatin, polyesterler, kitosanlar, vb. gibi farklı kaplama veya kabuk malzemeleri ile kapsüllenebilir [53]. Üretilen partiküllerin çapları genellikle birkaç nm ila birkaç mm arasındadır [51].

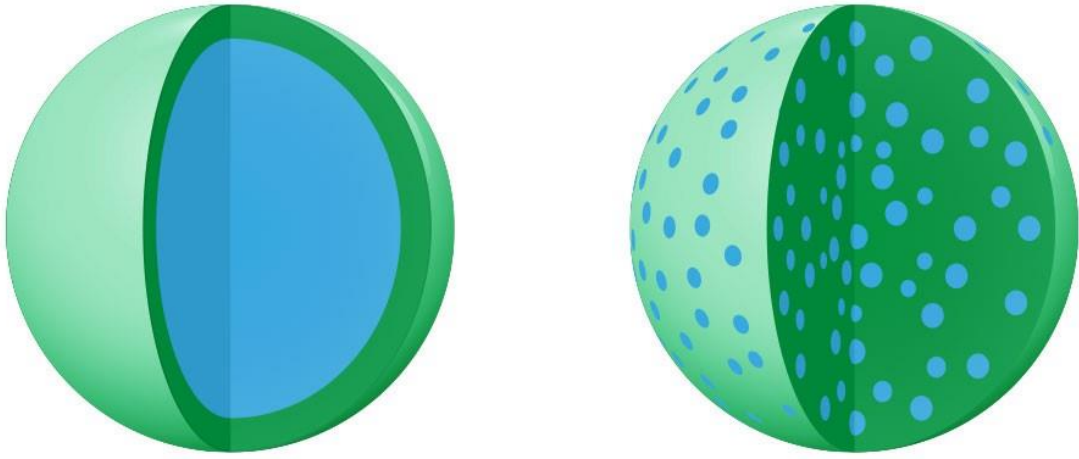
Yaklaşık 60 yıl önce geliştirilen enkapsülasyon teknolojisi, farmasötik sektörü (özellikle ilaç ve aşı dağıtımı için) ve gıda endüstrisi için önemli bir ilgi alanıdır [51].

Enkapsülasyon, işleme ve depolama sırasında biyoaktif bileşiklerin stabilitesini korumak ve gıda matrisi ile istenmeyen etkileşimleri önlemek için kullanılan umut verici bir teknolojidir [51].

Birçok nedenden dolayı gıdalara farklı maddeler eklenir. Pek çok gıda katkı maddesinin izin verilen seviyelerinin azaltılması ve kimyasal olarak türetilen maddelerin doğal kaynaklı olduğu düşünülen alternatiflerle değiştirilmesi yönelik son zamanlarda yükselen önemli bir trenddir. Birçok alanda doğal fonksiyonel bileşenin etkinliğini ve uygulama aralığını artırmak için mikrokapsül dağıtım sistemleri kullanılmaktadır [49].

Kapsüllenmiş materyaller nemden, ısıdan veya diğer aşırı koşullardan korunabildiğinden, bu tekniğe yönelik uygulamalar gıda endüstrisinde artmıştır, böylece stabiliteleri artırılmış ve canlılığı sürdürülmüştür [52].

Mikrokapsüller, boyutları mikronun altından birkaç milimetreye kadar değişebilen küçük kesecikler veya partiküllerdir [50]. Enkapsülasyon için birçok morfoloji söz konusu olabilir, Şekil 2.7’de gösterilen, bir kabukla sarılmış tek bir çekirdeğe sahip mononükleer kapsüller ve matrikse gömülü birçok çekirdeğe sahip agregalar en çok kullanılan iki ana formdur. Morfolojileri, proses teknolojilerinden ve kapsüllerin yapıldığı çekirdek ve duvar malzemelerinden etkilenir [50,52].



Şekil 2.7 Enkapsülasyonun iki ana formu; çekirdek-kabuk (solda), matriks (sağda)

Şu anda, izolasyon, saflaştırma veya yavaş salım amacıyla hemen hemen her malzeme kapsüllenebilir [52].

Gıda için tipik çekirdek maddeler, renklendiriciler ve boyalar, aromalar, mineraller, vitaminler, hayvan yemi bileşenleri, deodorantlar, yağlar, parfümler, stabilizatörler, tatlandırıcılar, besinler ve antioksidanlar olabilir [56].

Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon çeşitli nedenlerden dolayı kullanılmaktadır;

1. Hassas maddeleri dış ortamdan korumak (örneğin, ışık, oksijen ve su).
2. Çekirdek malzemenin dış ortama buharlaşmasını veya transfer hızını azaltmak.
3. Çekirdek malzemenin daha kolay işlenmesini sağlamak için:
 - a. Topaklanmayı önlemek,
 - b. Çekirdek malzemeye karışımdaki diğer malzemeler gibi bir boyut ve dış yüzey vererek karışım boyunca daha düzgün bir şekilde dağılım sağlamak,

- c. Sıvı bir malzemeyi katı bir forma dönüştürmek,
- d. Çekirdek malzemenin kolay karıştırılmasını sağlamak
4. Malzemenin uygun zamanda kontrollü salınımını sağlamak.
5. İstenmeyen tat ve koku, renk gibi organoleptik özelliklerini maskeleyerek.
6. Toksik maddelerin güvenli bir şekilde işlenmesini sağlamak.
7. Dehidrasyon, oksidasyon türevi reaksiyonları önlediği için raf ömrünü uzatmak [49,52,53,54].

Enkapsülasyon için çeşitli teknikler kullanılır. Genel olarak, biyoaktif maddelerin kapsüllenmesi üç aşamada gerçekleşir: (i) kapsüllenecek malzeme çevresinde duvar oluşturulması; (ii) istenmeyen sızıntının engellenmesi; (iii) istenmeyen malzemelerin dışarıda tutulmasının sağlanması [50].

Kapsüllerden bileşenleri salmak için çeşitli yöntemler mevcuttur. Salınım sahaya özel, aşamaya özgü olabilir veya pH, sıcaklık, ışınlama veya ozmotik şoktaki değişikliklerle gerçekleştirilebilir [52]. Gıda sektöründe en yaygın yöntem, solventle aktive olan salımdır. Kuru içecekler veya kek karışımlarına su eklenmesi buna bir örnektir [52]. Lipozomlar peynir yapımında kullanılmıştır ve margarin ve mayonez gibi gıda emülsiyonlarının hazırlanmasında kullanımı gelişmekte olan bir alandır. Kontrollü salım, taşıyıcı malzemeler, hazırlama yöntemleri ve tatlandırıcı immobilizasyonu alanlarında gıdaların kapsüllenmesini son gelişmeler arasındadır [52].

Mikrokapsülün enkapsülasyon etkinliği, polimerin konsantrasyonu, polimerin çözücü içinde çözünürlüğü, çözücü uzaklaştırma hızı, organik çözücünün suda çözünürlüğü vb. gibi farklı faktörlere göre değişiklik göstermektedir [53].

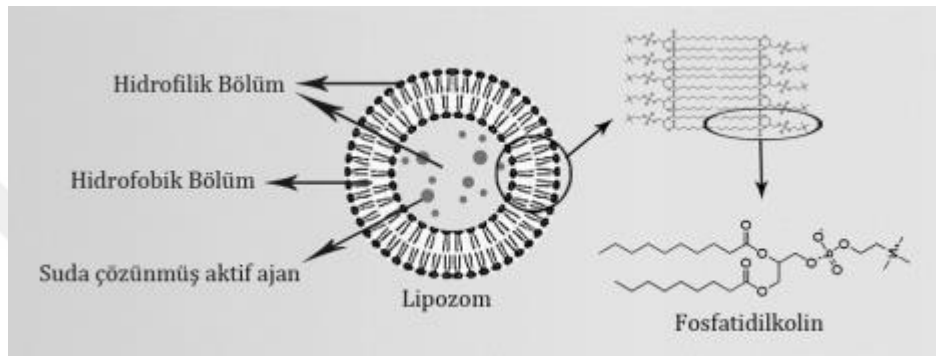
2.4 Enkapsülasyon Yöntemleri

Gıda ve nutrasötik uygulamalar için biyoaktif içerikleri enkapsüle edebilen çeşitli teknikler bulunmaktadır. Bunlar, kimyasal, fiziko-kimyasal ve fiziksel teknikler olarak üç grup altında toplanabilir. Kimyasal teknikler, moleküler inklüzyon ve lipozomlar ile tutuklama; fiziko-kimyasal yöntemler, koaservasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi; fiziksel teknikler ise püskürtürerek kurutma, püskürtürerek soğutma, ekstrüzyon, akışkan yataklı kaplama, elektrohidrodinamik yöntemler gibi teknikleri içerir [53,54,55,56].

2.4.1 Kimyasal Yöntemler

2.4.1.1 Lipozom ile Tutuklama

Lipozomlar (Şekil 2.8), kolesterol ve toksik olmayan doğal fosfolipidlerden oluşturulabilen, küresel şekilli mikroskobik yapay keseciklerdir [57,56]. Biyouyumluluğunun yanı sıra boyutları ve hem hidrofobik hem de hidrofilik karaktere aynı anda sahip olmaları, lipozomları aktif bileşen dağıtımı için umut verici bir sistem haline getirir [57]. Bu sayede hem lipofilik hem de hidrofilik maddeleri enkapsüle ederken lipozomlardan yararlanılabilir [56,59].



Şekil 2.8 Lipozomun yapısı [60]

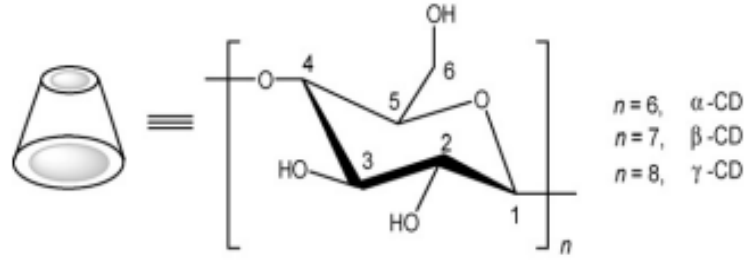
Gıda endüstrisinde, lipozomlar proteinleri, enzimleri, vitaminleri, antioksidanları ve aromaları kaplamak için araştırılmaktadır. Lipozomların diğer kapsülleme teknolojilerine göre en büyük avantajlarından biri, yüksek su aktiviteli uygulamalarda suda çözünür malzemeye kazandırdığı stabilitedir [58]

Lipozomal enkapsülasyonun, aşırı pH ve sıcaklık dahil olmak üzere bir dizi çevresel ve kimyasal değişikliğe karşı kapsüllenmiş materyalleri stabilize ettiği bilinmektedir [56,58].

2.4.1.2 Moleküler İnküzyon

Supramoleküller, belirli işlevleri olan, moleküller arası etkileşim yoluyla iki veya daha fazla molekül, iyon veya koordinasyon bileşiği ile ilişkili karmaşık ve düzenli moleküler kümelerdir. Bu teknikte kullanılan moleküllere, taç eterler, kripatlar, kaliksarenler, siklodekstrinler (CD'ler) vb. moleküller örnek gösterilebilir [62]. Siklodekstrinler, *Bacillus macerans* ve *Bacillus circulans* gibi mikroorganizmalar tarafından fermentasyon yoluyla nişastadan üretilir. Bu mikroorganizmalardaki siklodekstrintransglikozidaz adı verilen bir enzim, kısmen hidrolize nişastayı halkada sırasıyla altı, yedi veya sekiz glikoz molekülü içeren alfa-, beta- ve gama-siklodekstrinlere dönüştürür [56,61,62]. Siklodekstrinler, glukopiranoz birimlerinden oluşur ve α -1,4-glikozidik bağlarla

bağlanmış siklik oligosakkaritlerdir (Şekil 2.9). Hidrofobik boşluk ve hidrofilik yüzeyden oluşan kesik koni biçiminde moleküllerdir [56,62,63].



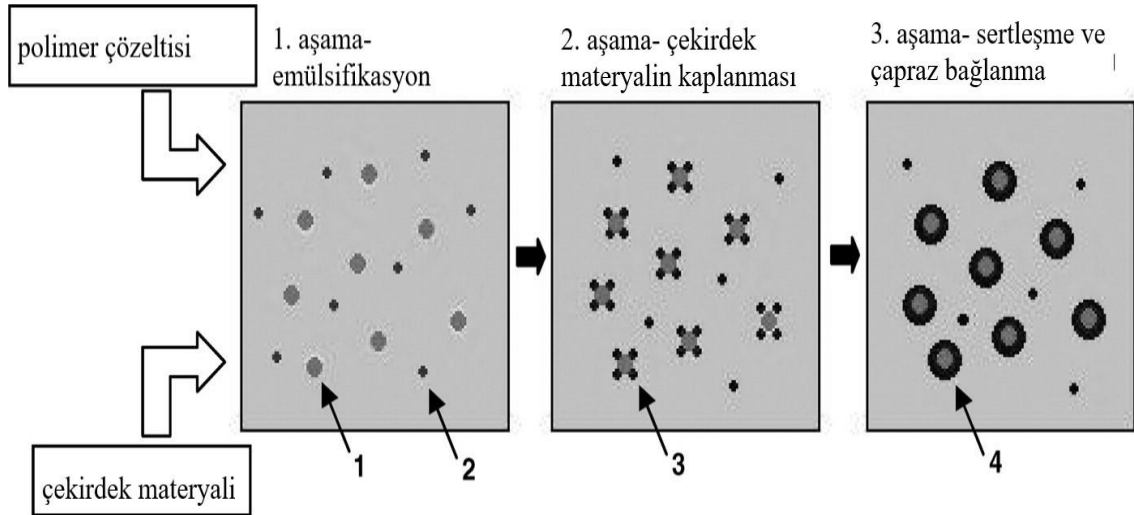
Şekil 2.9 Siklodekstrinlerin yapısı [62].

Sarımsak ve soğan yağları, siklodekstrin tarafından kokusuz bileşikler olarak kompleks hale getirilebilir. Yağda çözünen A, E ve K vitaminleri de bu şekilde stabilize edilebilir. Bununla birlikte, siklodekstrinlerin gıdalar için kullanımı, yalnızca Japonya ve Doğu Avrupa'da onaylanmıştır [52].

2.4.2 Fiziko-kimyasal Yöntemler

2.4.2.1 Koaservasyon

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC, 1997) tarafından yapılan tanımlamaya göre koaservasyon, bir kolloidal sistemin iki sıvı faza ayrılmasıdır [65,66]. Koaservasyon genel olarak, sürekli çalkalama altında gerçekleşen üç adımdan oluşur (Şekil 2.10.). Önce, bir su içinde yağ emülsiyonu (yüzey aktif hidrokolloid içeren sulu bir çözelti içinde yağın dağılması) oluşur, ikinci aşamada ise kaplama meydana gelir. Son aşama, kaplamanın stabilizasyonudur (kendi kendine yeten mikrokapsüller oluşturmak için termal, çapraz bağlama veya desolvasyon teknikleri kullanılarak kaplama sertleştirilir) [53,61,64,66].



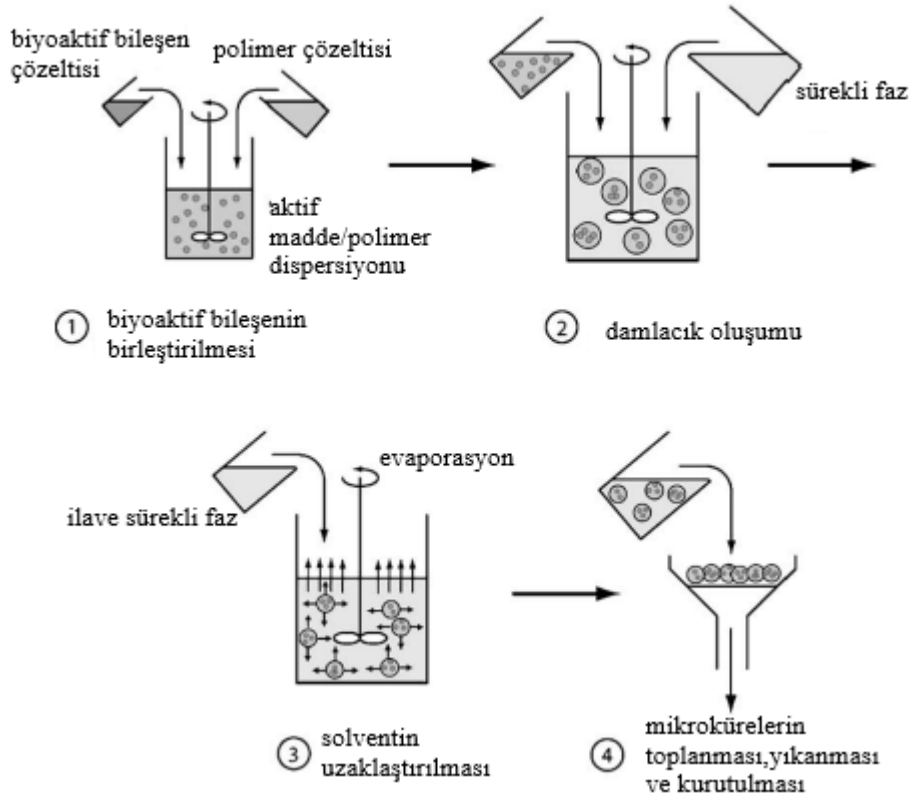
Şekil 2.10 Koaservasyon ile mikrokapsül hazırlamanın genel aşamaları (1) çekirdek malzeme; (2) polimer; (3) polimer kaplamanın çekirdek malzeme üzerine çökeltilmesi; (4) mikrokapsüller [66].

Basit ve kompleks koaservasyon olmak üzere iki tip koaservasyon prosesi bulunmaktadır [56,61,64,65,66].

Kompleks koaservasyon, çeşitli hidrofobik ve hidrofilik gıda ve tarım besinleri ve kimyasallarını kapsüllemek ve omega-3 lipidleri ve hassas gıda bileşenleri gibi gıda bileşenlerinin kapsüllenmesi için umut verici ve verimli bir yöntem olarak ortaya çıkar [64]. Bununla birlikte, basit koaservasyon sadece bir polimer içeren bir tekniktir, gıda endüstrisinde pek kullanılmaz [65].

2.4.2.2 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü buharlaştırma yönteminde, ilk aşamada, polimer, içinde aktif maddenin de çözüldüğü organik bir çözücüde çözülür. Daha sonra oluşan çözelti, uygun bir stabilizatör içeren karıştırılmakta olan sulu bir çözeltiye damla damla ilave edilir ve polimer damlacıkları oluşur. Oluşan polimer kapsülleri sertleştirilir. Bu sertleştirme işlemi, çözücünün polimer damlacıklarından ısı veya azaltılmış basınç uygulanarak buharlaştırılmasıyla gerçekleşir. Daha sonra partiküller yıkanır ve kurutulur (Şekil 2.11) [56].



Şekil 2.11 Çözücü buharlaştırma yöntemi ile mikroküre üretimi temel aşamaları [67]. Biyoaktif bileşik partiküller, emülgatörler ile stabilize edilir. Kazeinler, peynir altı suyu proteinleri ve soya proteinleri gibi gıda proteinleri, gıda emülsiyonları hazırlamak için kullanılan en önemli emülgatörler arasındadır [69]. Çözücü buharlaştırma tekniği ile mikroenkapsülasyon için farklı yöntemler vardır. Etkili bir kapsülleme için yöntemin seçimi, maddenin hidrofilikliğine veya hidrofobikliğine bağlıdır [68].

2.4.3 Fiziksel Yöntemler

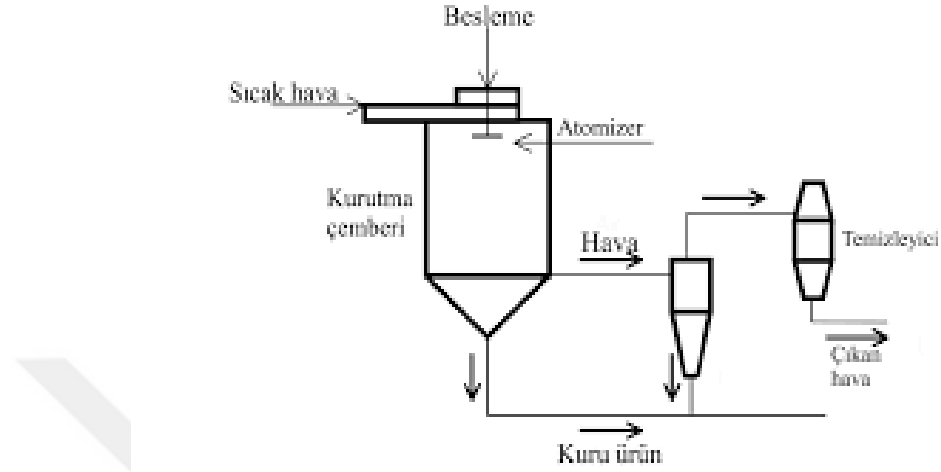
2.4.3.1 Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma ekonomik, esnek, sürekli bir işlemdir. Ayrıca, kuru, stabil gıda katkı maddeleri ve aromalarının hazırlanması için uygun olmasından dolayı oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir [49,50,52,71]. Püskürtmeli kurutma, norbiksin ve astaksantin gibi karotenoidleri, bayberry ve propolisten elde edilen fenolik bileşikler ve B12, a-tokoferol ve askorbik asit gibi vitaminleri kapsüllemek için kullanılmıştır [72].

Enkapsülasyonda, duvar malzeme olarak kullanılan, modifiye nişasta, maltodekstrin, sakız vb. maddeler hidratlanır. Çekirdek malzeme, duvar malzemeleri ile homojenleştirilir. Karışım daha sonra bir püskürtmeli kurutucuya beslenir ve bir meme

veya çıkık vasıtasıyla atomize edilir. Püskürtülen damlacıkların suyu, sıcak hava ile temas ettirilerek buharlaştırılır ve damlacıklar kurutulur. Kapsüller daha sonra kurutucunun dibine düşer ve toplanır [50,56,70].

Püskürterek kurutma yöntemi Şekil 2.12'deki gibi özel bir aparat ile gerçekleştirilir [73].

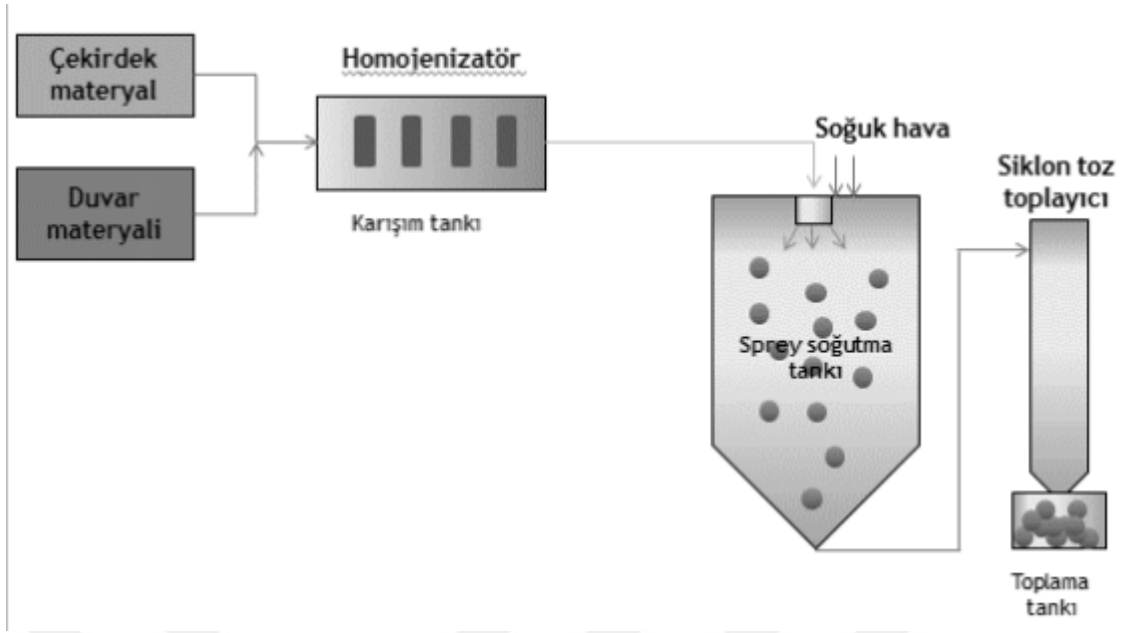


Şekil 2.12 Püskürterek kurutma aparatının şematik gösterimi [73].

2.4.3.2 Püskürterek Soğutma Ve Püskürterek Dondurma

Püskürterek soğutma ve püskürterek dondurma, püskürterek kurutmaya benzer yöntemlerdir. Çekirdek malzemenin sıvılaştırılmış bir kaplama malzemesine dağıtılmasını ve ısıtılmış memelerden kontrollü bir ortama püskürtülmesini içerir (Şekil 2.12) [49,74].

Bununla birlikte, bu işlemler ve püskürtmeli kurutma arasındaki temel farklar, kurutma odasında kullanılan havanın sıcaklığı ve uygulanan kaplamanın türüdür. Püskürterek soğutma ve dondurma yönteminde, püskürterek kurutmada olduğu gibi sıcak hava kullanılmaz. Bunun yerine erimiş bir yağ veya mum kaplamanın katılma noktasının oldukça altındaki ortam sıcaklıklarına soğutulan hava kullanılarak atomizasyon gerçekleştirilir [49,52,59,74].



Şekil 2.13 Püskürterek soğutma yöntemiyle enkapsülasyon işlemi [75]

Püskürterek soğutmada, kaplama tipik olarak 32 - 42°C aralığında bir erime noktasına sahip parçalanmış veya hidrojene bir bitkisel yağdır. Püskürtmeli dondurmada, başka malzemeler de kullanılabilmesine rağmen, duvar tipik olarak erime noktası 45 - 122°C arasında olan bir bitkisel yağdır [59,52].

Bu teknikler, mineraller, suda çözünür vitaminler, enzimler, asitleştiriciler ve bazı aromalar gibi suda çözünür çekirdek malzemeleri kapsüllemek için kullanılır [49,52,59,74].

Donmuş sıvılar, ısıya duyarlı malzemeler ve normal çözücülerde çözünmeyenler bu tekniklerle kapsüllenebilir [52].

2.4.3.3 Ekstrüzyon Yöntemi

Ekstrüzyon nispeten düşük sıcaklıkta bir kapsülleme yöntemidir ve erimiş bir karbonhidrat kütlesi içinde dağılmış bir çekirdek malzemeyi bir dizi kalıp boyunca bir dehidrasyon sıvısı banyosuna zorlamayarak gerçekleştirilir [49].

Ekstrüzyonun avantajı, malzemenin duvar malzemesi tarafından tamamen izole edilmesidir. Genel olarak, C vitamini, renk maddeleri için uygulanır ve raf ömrünün en az 2 yıla kadar uzatılması için kullanılır. Bu yöntemle çok sayıda aroma da kapsüllenmiştir [52].

Bu yöntem altında, karbonhidratlara veya şeker gibi kaplama materyallerine su veya diğer plastikleştiriciler ve yumuşatıcılar eklenir, bunlar daha sonra eritilir. Daha sonra aktif

madde eklenir, aktif madde içeren eriyik yüksek basınç altında ekstrüder kalıbından dışarı çıkmaya zorlanır, hızlı bir şekilde kurutulduğunda ekstrüder, damlacıkları tamamen saran amorf, camsı ama sıkı bir kütle oluşturarak küçük iğne şeklinde topaklar oluşturur [56].

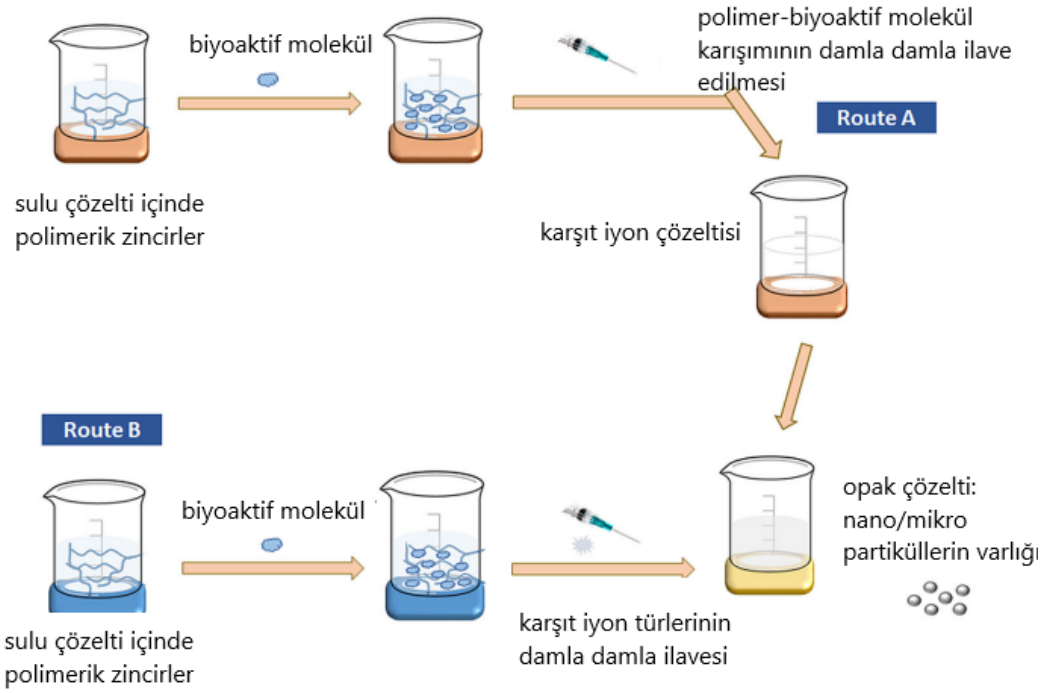
Farklı tipte ekstrüder kullanımına, ekstrüzyon durumuna ve ekstrüdat ürününün türü gibi diğer parametrelere dayalı farklı ekstrüzyon teknolojileri vardır. Ekstrüzyon teknolojisi beş gruba ayrılabilir [76]:

1. Sıcakta eriyen ekstrüzyon
2. Eriyik enjeksiyonu
3. Santrifüj/birlikte ekstrüzyon
4. Elektrostatik/elektroeğirme
5. Gaz Doymuş Çözeltilen (PGSS) Parçacık [76]

2.4.3.4 İyonotropik Jelasyon

İyonotropik jelasyon (IG), belirli koşullar altında zıt yüklerdeki iki iyonik tür arasında elektrostatik etkileşimler yoluyla nanopartiküllerin ve mikropartiküllerin üretilmesine izin veren bir tekniktir [95,96,98]. Reaksiyona bir ilaç veya biyoaktif molekül eklendiğinde, polimerik zincirler arasında sıkışıp nanoparçacık/mikroparçacık yapısı içinde yakalanmasıyla sonuçlanabilir. Bu tür bir formülasyon biyoaktif molekülün kontrollü salınımına yardım eder ve moleküllerin birlikte kapsüllenmesi, partiküllerin bölgeye özgü işlevselleştirilmesi ve aktif bileşenin biyoaktivitesinin artırılması gibi potansiyeller sunar [96].

Biyoaktif bileşeni kaplama özelliğine sahip olan ve salım hızı geciktirici görevi gören doğal polielektrolitler, kimyasal yapılarında belirli anyonlar içerir. Bu anyonlar, çok değerlikli katyonlarla birleşerek ağ yapısı oluşturur ve anyon bloklarına bağlanarak jelleşmeyi indükler [95].



Şekil 2.14 İyonotropik jelasyon yöntemiyle nanoparçacıkların/mikroparçacıkların sentezinin şematik gösterimi. İşlem, karıştırma altında ve 25°C civarında bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Dispersiyondaki partiküller santrifüjleme ile toplanabilir [96].

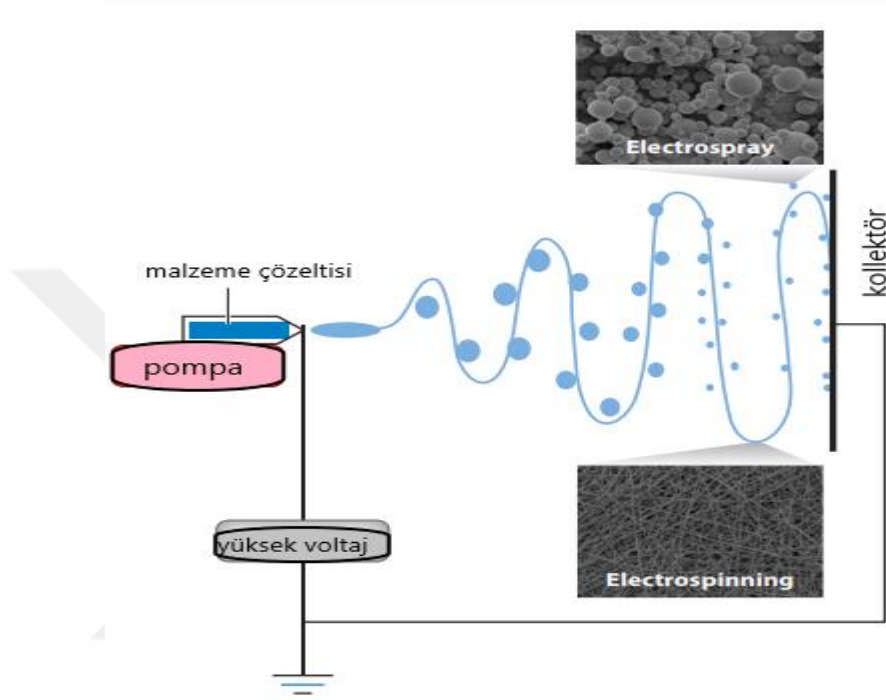
Hidrojel mikropartiküller, çekirdek malzeme ile yüklü bir polimerik çözeltinin, bir katyonik polielektrolit içeren sulu çözeltiye damlatılmasıyla üretilir (Şekil 2.14). Katyonlar, aktif madde yüklü polimerik damlalara difüze olur ve iyonik olarak çapraz bağlı kısımdan oluşan üç boyutlu bir kafes oluşturur [95,98]. Genellikle bu işlemlerde, sodyum aljinat, jelatin, karboksimetil selüloz ve kitosan gibi doğal, hidrofilik ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler kullanılır [98].

İyonik jelasyonun, kapsüllenmiş maddelerin biyoyararlanımını arttırmak dışında başka avantajları da vardır [96]. Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilen biyolojik olarak uyumlu polimerlerin kullanımı, formülasyona muko-yapışkanlık ve başka biyolojik özellikler sağlar [96].

İyonik jelleşme yöntemi pahalı ekipmana veya pahalı reaktiflere ihtiyaç duymaz ve nispeten ucuz ve hızlıdır [96].

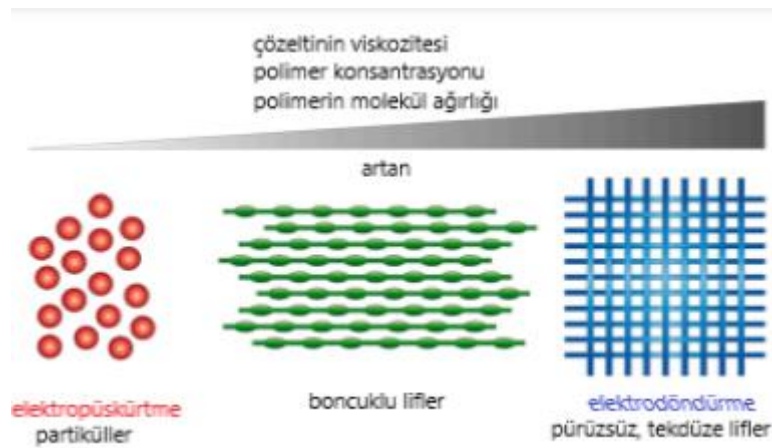
Elektrospreyleme gibi diğer kapsülleme tekniklerinin dar bir parçacık boyutu dağılımı elde ettiği bilinmektedir; iyonotropik jelasyon ile durum her zaman böyle değildir. Polidispersiyon indeksleri (PDI) genellikle 0.1'den yüksektir [97]. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı, farklı polimerler ile sınırlı sayıda çalışma olmasıdır [96].

Elektroeğirme ve elektropüskürtme, fonksiyonel gıda uygulamaları için sırasıyla yüksek performanslı nano/mikrofiberler ve nano/mikrokapsüller üretme imkanı sunar. Uygun maliyetli ve ölçeklenebilir teknolojilerdir. Bu tekniklerde, yüksek voltajlı bir elektrostatik alanı kullanılır (Şekil 2.16), böylece bir püskürtme memesinden bir sıvı jetinin fırlatılması sağlanır [79].



Şekil 2.16 Elektrohidrokinamik proseslerin şeması

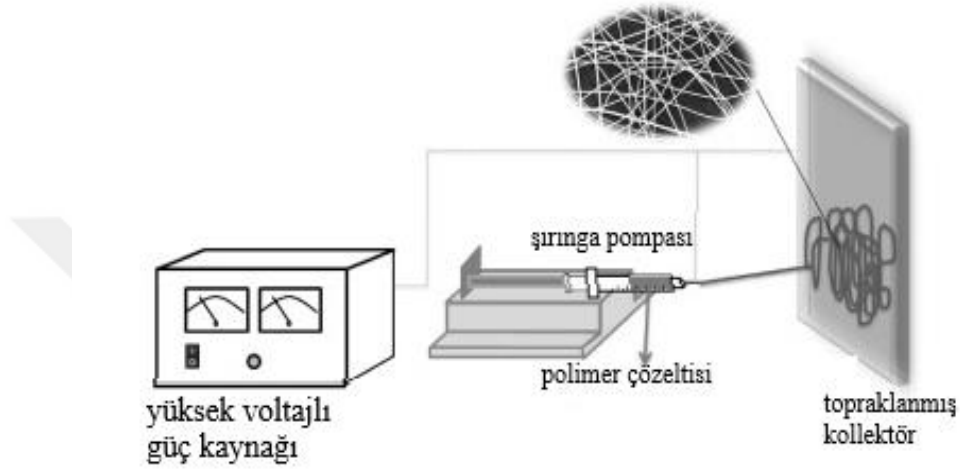
Şekil 2.17’de görüldüğü gibi bu işlemler çeşitli faktörlerden etkilenir [81].



Şekil 2.17 Elektrohidrokinamik yöntemleri etkileyen faktörler [81].

- **Elektroeğirme**

Elektroeğirme, doğal ve sentetik polimerlerden, seramiklerden ve kompozitlerden üretilen sürekli nano/mikro fiberlerin üretimi için kullanılan elektrohidrokinamik yöntemdir [54,77,79]. Tipik bir elektroeğirme düzeneği (Şekil 2.18), yüksek voltajlı bir güç kaynağı, polimer çözeltisinin yerleştirildiği bir şırınga (spinneret), bir şırınga pompası ve topraklanmış bir iletken kollektörden oluşur [77,79,83].

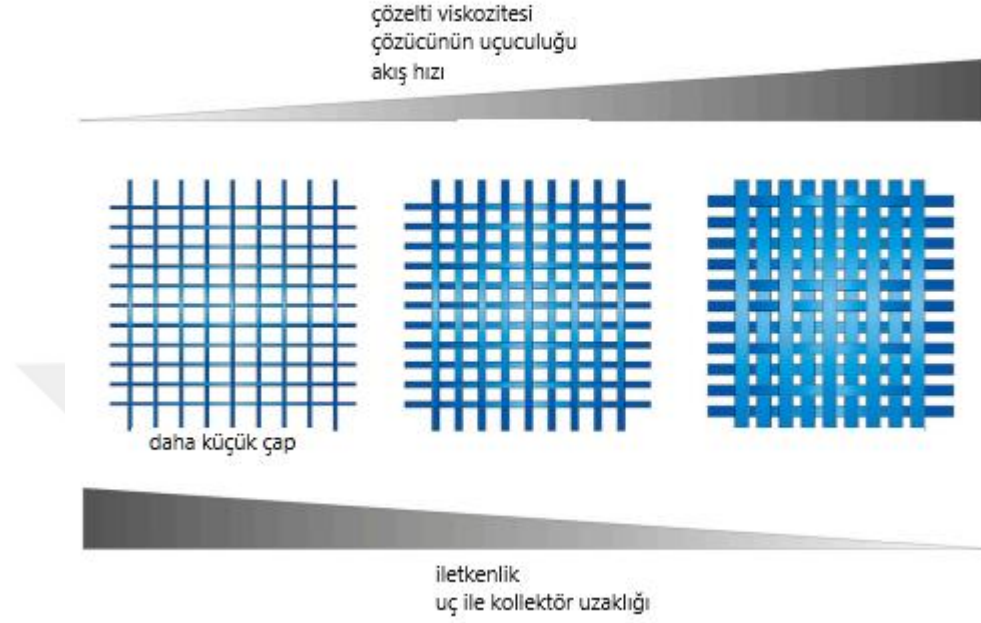


Şekil 2.18 Elektroeğirme sisteminin basit şematik gösterimi

Elektroeğirmede, bir polimer çözeltisi veya eriyik polimer ilk önce bir şırınga pompası ile iğne ucunda bir damlacık oluşturmak üzere ekstrüde edilir. Daha sonra, iğne ucu ile iletken arasına bir elektrik alanı uygulanır ve damlacığın yarım küre yüzeyi, iç elektrostatik itme ve dış kulombik kuvvet dahil olmak üzere iki ana elektrostatik kuvvetin etkisiyle konik bir şekle dönüştürülür. Elektrik alan kuvvetinin artmasıyla, asılı damlacık yüzeyinde daha fazla elektrik yükü birikir, özellikle elektrik alan, elektrostatik itmenin polimer çözeltisinin yüzey gerilimini etkisiz hale getirdiği kritik bir değere ulaştığında, elektrik yüklü polimer jeti püskürtülür. Taylor konisinin ucundan zıt yükler ile toplayıcıya doğru yönlendirilir. Jet toplayıcıya doğru sürüldüğünde, fazla elektrik yükleri jetin kamçılama veya eğilme hareketine neden olur, sonuç olarak jetin uzaması ve çözücünün hızlı buharlaşması gerçekleşir ve polimer nanolifler topraklanmış kollektör üzerinde biriktirilir [54,77,79,80,82,83].

Geleneksel kapsülleme teknikleri ile karşılaştırıldığında, elektro-eğirme işleminin en önemli avantajı, yapının korunması için önemli olan ısıya maruz kalmamasıdır. Oluşan lifler içine kapsüllenmiş biyoaktif bileşikler, gelişmiş stabilite ve işlevselliğe sahiptir [80,54].

Lifler, polimer konsantrasyonundan, çözeltinin moleküler ağırlığından ve viskozitesinden, uygulanan voltajdan, uçtan toplayıcıya olan mesafeden ve akış hızından vb faktörlerden etkilenir (Şekil 2.19) [54].



Şekil 2.19 Çözelti ve işleme parametrelerinin elektroğirirmede elde edilen liflerin çapına etkisi [81].

- **Elektropüskürtme**

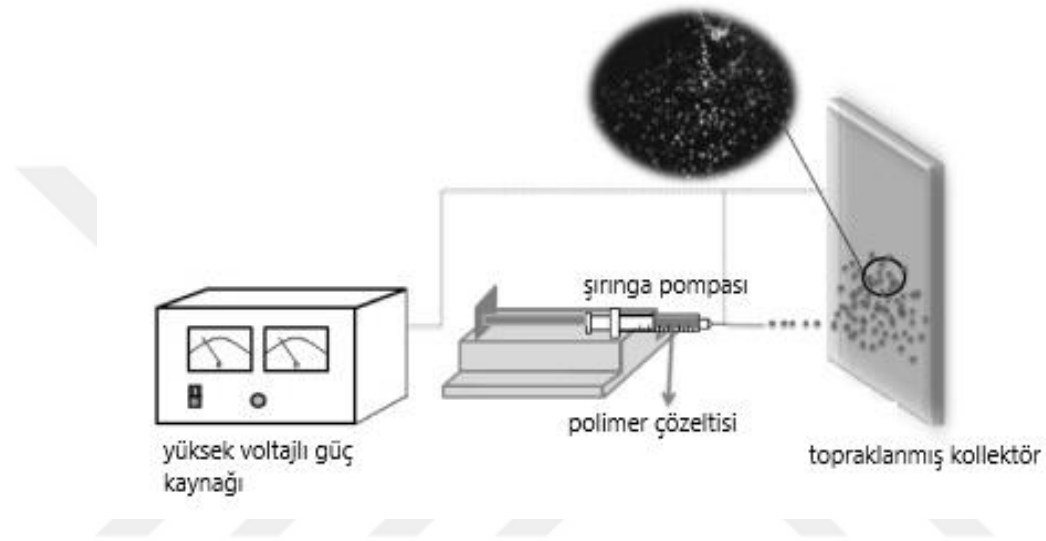
Elektropüskürtme, elektrohidrokinamik atomizasyon olarak da bilinen bir sıvı atomizasyon yöntemidir [54,84]. Elektropüskürtme ilkesi, bir kılcal damardan çıkan bir sıvı damlacığına uygulanan bir elektrik alanının, damlacık ara yüzünü deforme edebildiğini belirtir [84].

Bu teknikle, ölçek büyütme, partiküllerin polidispersitesi ve düşük kapsülleme verimliliği gibi sınırlamaların üstesinden gelmek mümkündür [54].

Elektrik yükü, damlacık içinde, Taylor konisini oluşturan, damlacığın yüzey gerilimi ile rekabet eden elektrostatik bir kuvvet üretir. Sonuç olarak, yüksek voltajın ile üretilen elektrostatik kuvvet, damlacığın yüzey gerilimini yenebilir. Daha sonra, mikro ila nano ölçekteki daha küçük yüklü damlacıklar birincil damlacıktan çıkarılır, böylece kütlesini önemli ölçüde azaltmadan yükü azaltılır. Yüklerin Coulomb kuvveti tarafından itilmesi nedeniyle, damlacıklar iyi dağılır ve toplayıcıya doğru uçuşları sırasında birleşmezler.

Elektropüskürtme sırasında birkaç püskürtme modu meydana gelebilir, stabilitesi ve tekrarlanabilirliği nedeniyle en çok istenen tek koni jet modudur [84].

Elektroegirmede olduğu gibi, polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulandıktan sonra ve kritik voltaja ulaşıldığında, iğne ucundan damlalar şeklinde yüklü bir sıvı jeti püskürtülür ve kolektöre yönlendirilir [54,77]. İki teknik arasındaki fark, polimer çözeltisi konsantrasyonudur. Püskürtme işlemi, kararsız bir jet geliştirmek ve ince damlacıklar oluşturmak için düşük bir polimer konsantrasyonuna ihtiyaç duyar [54].



Şekil 2.20 Elektropüskürtme yönteminin basit şematik gösterimi

Aynı deney düzeneği (Şekil 2.20) hem elektroegirme hem de elektropüskürtmede kullanılabilir. Her iki teknik de aynı etki faktörlerine bağlıdır [77]. Elektroegirmeden farklı olarak, elektropüskürtme, jeti damlacıklara ayıran kütle ve yüzey elektrohidrodinamik kuvvetlerinin etkileşiminden faydalanır.[48] Yüzey gerilimi nedeniyle, jet parçaları küresel bir şekil alır. Elektroegirme gibi bu süreç de çok sayıda parametreden etkilenir [78]. Elektropüskürtme ile elde edilen parçacıkların morfolojisi ve çapı, kapsüllenmiş biyoaktif bileşenlerin salınımı üzerinde etkilidir. Oluşan küresel parçacıkların düzensiz şekilli parçacıklardan daha verimli olduğu görülmüştür. Morfoloji ve çap, çözeltinin viskozite, polimer konsantrasyonu, polimerin moleküler ağırlığı, yüzey gerilimi, iletkenlik gibi özelliklerinden, uygulanan voltaj, uçtan kolektöre mesafe, akış hızı gibi işlem değişkenlerinden ve sıcaklık, nem, hava akımı gibi çevresel parametrelerden etkilenir [54].

Gerilim, iletkenlik ve püskürtülen çözeltinin yüzey gerilimi gibi parametreler arttıkça partikül çapı küçülür [78]. Püskürtülen çözeltinin akış hızı, yoğunluğu ve viskozitesi gibi

parametreler arttıkça ise partikül çapı büyür [78] Uygulanan voltajın artması partikül çaplarının azalmasına neden olur [77]. Elde edilen yapıların çapları ve morfolojileri, memecik ile toplayıcı arasındaki mesafeden de etkilenir. Daha küçük mesafelerde çözücünün tamamen buharlaşması için yeterli zamanı yoktur, bu da partiküllerde kusurlara neden olur [77].

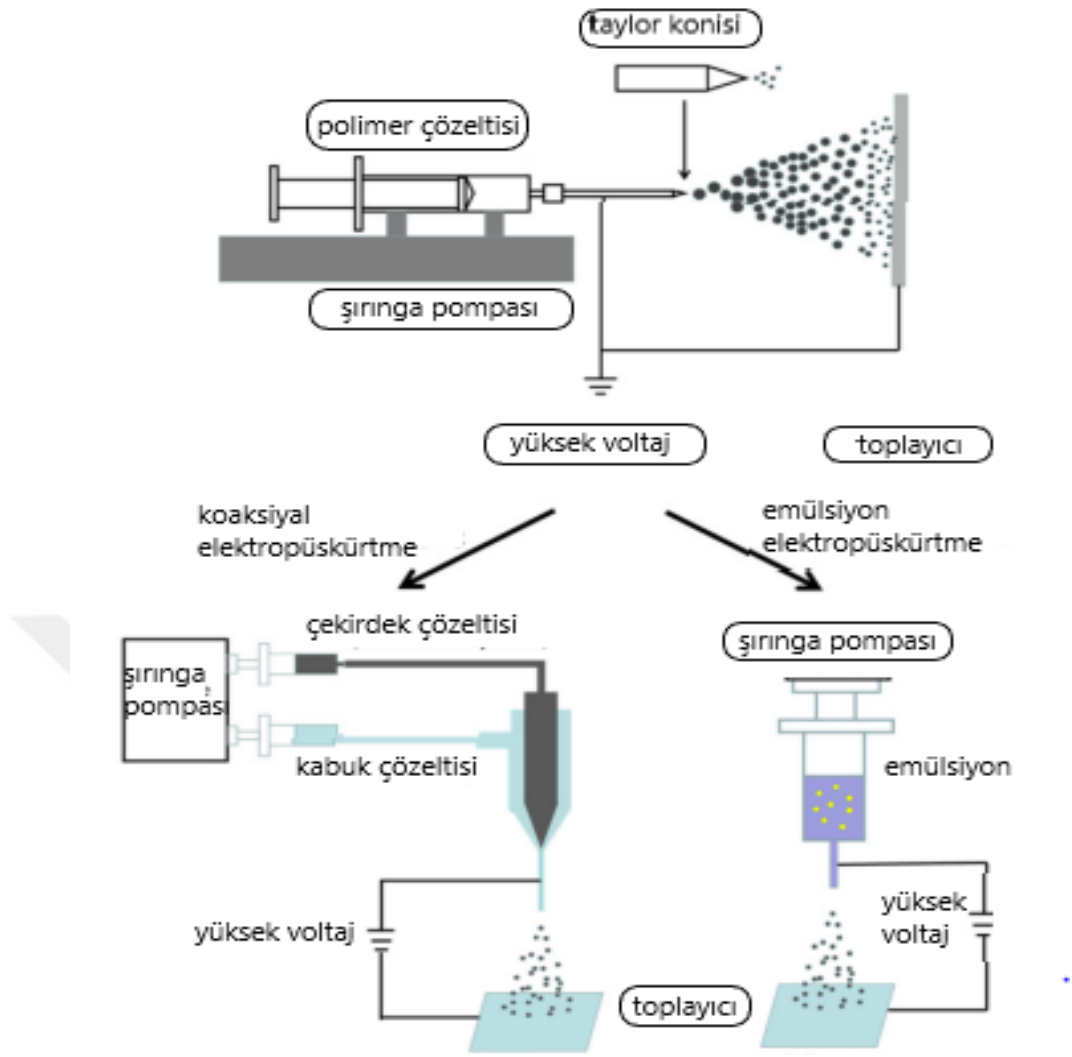
Düşük çözelti konsantrasyonlarında, genellikle çökmüş parçacıklar elde edilirken, çözelti konsantrasyonunun artırılmasıyla daha küresel parçacıklar oluşur. Kritik bir çözelti konsantrasyonunun yakınında, ip üzerinde mikropartikül morfolojileri tipik olarak gözlenir, yani elektroegirme lifleri partiküllerle birlikte bulunurken, kritik çözelti konsantrasyonunun üzerinde tek tip lifler üretilir [77].

Diğer kapsülleme teknolojileriyle karşılaştırıldığında, elektropüskürtme aşağıdaki avantajlara sahiptir [55]:

1. Elde edilen partiküller boyut olarak küçüktür ve çapları bir mikronun altındadır;
2. Boyut dağılımı dar ve hatta monodisperse yakındır;
3. Yüklü damlacıklar birbirini iter ve birikmez;
4. Nihai ürünün boyutu ve şeklinin kontrolü nispeten kolaydır;
5. Isı gerektirmeyen bir işlem olduğundan, biyoaktif bileşiklerin aktivitesi, kimyasal yapı ve fiziksel özellikleri değiştirmeden etkin bir şekilde korunur;
6. Protokolü ve prosesi basittir.

Bu avantajlar, biyoaktif bileşiklerin ışık, ısı ve oksijen gibi aşırı ortamlardan korunmasında önemli roller oynamaktadır. Ayrıca, elektropüskürtmeye dayalı kapsülleme teknolojisi, biyoyararlanımı, kontrollü salınımı hedefler ve istenmeyen aromaların maskelenmesine, biyoaktif bileşiklerin buharlaşma veya uçuculuk kaybını azaltmaya katkıda bulunur [55].

Son zamanlarda, biyoaktif bileşiklerin kapsülleme verimliliğini daha da geliştirmek ve elektropüskürtmenin uygulama kapsamını genişletmek, çeşitli işlevlere sahip partiküller üretmek için elektropüskürtme cihazlarının yeni modifikasyonları araştırılmaktadır. Bunlar koaksiyel ve emülsiyon elektropüskürtme yöntemleridir (Şekil 2.21) [55].



Şekil 2.21 Koaksiyel ve emülsiyon elektropüskürtme yöntemleri [55].

Koaksiyel elektropüskürtmede, iç içe iki eş merkezli iğneden oluşan bir memecik kullanır [81]. Kapsüllenmiş bileşikler polimer çözeltisi ile birlikte pompalanır [55]. Çekirdek çözelti iç iğneden pompalanırken, kabuk çözeltisi dış iğneden çıkar ve tek adımda çekirdek-kabuk yapıları oluşturur [81]. Damlacık uçuşu sırasında, çekirdek-kabuk parçacıkları, kaplama çözeltisinin çözücüsünün uçucu hale getirilmesiyle elde edilir. Katı parçacıkların koaksiyel yöntemle üretilebileceği belirtilmelidir. Bu tekniğin bir başka avantajı, çok katmanlı kaplama yapıları oluşturmak için kullanılabilmesi ve aktif bileşenlerin serbest bırakma kinetiğinin, koruyucu kabuğun katmanlarının sayısı değiştirilerek ayarlanabilmesidir [55].

Emülsiyon elektropüskürtme, suda çözünmeyen biyoaktif bileşiklerin kapsüllenmesi için etkili bir teknolojidir. Biyoaktif bileşikler ilk olarak emülsiyon damlacıkları içine kapsülendir ve daha sonra emülsiyona kabuk polimeri eklenerek elektropüskürtme

çözeltisi hazırlanır. Parçacıklar, elektropüskürtme çalışma parametrelerinin ayarlanmasıyla elde edilir. Burada, elektropüskürtülmüş parçacıkların oluşumu, polimerin katılaşmasından ve emülsiyon üzerindeki kaplamadan kaynaklanır. Elektrospreyleme işlemine ek olarak, viskozite, damlacık boyutu, emülsiyon stabilitesi vb. emülsiyon özelliklerinin de partiküllerin hazırlanmasında önemli roller oynadığına dikkat edilmelidir [55].

2.5 Kaplama Malzemeleri

Kaplama maddeleri, kaplanacak malzemeye ve mikrokapsüllerde istenen özelliklere bağlı olarak çok çeşitli doğal veya sentetik polimerler olabilir [86].

Farklı tür, köken ve özelliklerdeki maddeleri hapsedmek, kaplamak veya kapsüllemek için kullanılabilen çok sayıda madde bilinmektedir. Ancak bunların yalnızca sınırlı bir kısmı gıda uygulamaları için “genel olarak güvenli kabul edilen” (GRAS) malzemeler olarak onaylanmıştır [85].

Gıda sektöründe mikrokapsülasyonda kullanılan kaplama malzemeleri genellikle biyomoleküllerdir. Karbonhidrat polimerleri/polisakkaritler, proteinler ve lipidler gıda sektöründe mikrokapsülasyon için kullanılan biyomoleküllerdir [85,86,87].

Tablo 2.1’de gıda endüstrisinde mikrokapsülasyon için tek başına veya başkalarıyla kombinasyon halinde kullanılan biyomoleküller gösterilmektedir [85].

Tablo 2.1. Enkapsülasyonda kullanılan kaplama malzemeleri

Köken	Karbonhidrat polimeri	Protein	Lipid
Bitki	Nişasta	Gluten (mısır)	Yağ asidi/alkoller
	–Türevleri	İzolatlar (bezelye,soya)	Gliseritler
	Selüloz		Vakslar
	–Türevleri		Fosfolipitler
	Bitki salgıları		
	–Gam arabic		
	–Gam karaya		
	–Meskit gamı		
	Bitki ekstraktları		
	–Pektin		
	–Galaktomannan		
	–Çözünür soya fasulyesi polisakkaridi		
Deniz	Karagenan		
	Aljinat		
Mikrobiyal/hayvansal	Ksantan	Kazeinler	Yağ asidi/alkoller
	Gellan	Peynir altı suyu proteini	Gliseritler
	Dekstran	Jelatin	Vakslar
	Kitosan		Fosfolipitler (Şellak)

Duvar malzemesinin doğru seçimi, mikrokapsülün kapsülleme verimliliğini ve stabilitesini etkilediği için çok önemlidir [87].

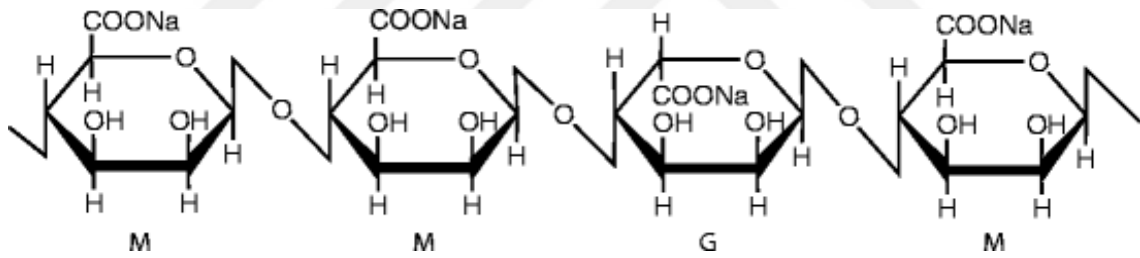
Etkili bir kaplama malzemesi, yüksek konsantrasyonda iyi reolojik özelliklere sahip olmalıdır. Aktif bileşen ile stabil bir emülsiyon veya dispersiyon üretmeli, işleme ve

depolama sırasında aktif malzeme ile reaksiyona girmemeli ve bozmamalıdır. Ayrıca, istenen çözünürlük ve aktif malzeme salma özelliklerini karşılamalıdır [86]. Kaplama materyali, olumsuz koşullara karşı çekirdeğe maksimum koruma sağlama yeteneğine sahip olmalıdır. Gıda uygulanabilirliğinin yanında ekonomik olmalı ve hoş olmayan tatları bastırmalıdır [87].

2.5.1 Aljinat

Aljinat, denizdeki kahverengi alglerden ve belirli bakteri türlerinden elde edilen, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, doğal olarak oluşan bir polisakkarittir.[55] [58][65] Ca^{2+} , Ba^{2+} , veya Fe^{3+} gibi çok değerlikli katyonlarla hidrojeller oluşturur.[58][59] Sodyum aljinat (Şekil 2.22), aljinik asidin bir sodyum tuzu, doğal bir polisakarit ve 1,4-bağlı β -D-Mannuronik asit (M) ve α -D-gluronik asit (G) kalıntılarından oluşan lineer bir polimerdir [85,86,95].

Deniz yosunu ekstraktına, izolasyon sürecine veya biyoteknolojik prosedüre bağlı olarak, iki yapısal birimin oranı ve sıralı düzeni büyük ölçüde değişir. Polimer zincirinde çeşitli uzunluklarda M ve G blokları bulunabilir [85].



Şekil 2.22 Sodyum aljinat polimer zincirinin temel kimyasal yapısal birimleri

Aljinat bileşimi, yapısı ve molar kütlesi fonksiyonel özelliklerini etkiler. Aljinatın sudaki çözünürlüğü, ayrışma hızı ve karşı iyonun tipi ile ilgilidir. $pH < 3$ 'te hem M- hem de G- yapıları aljinik asit olarak çökelir. Bununla birlikte, daha homojen blok yapıları içeren aljinatlara kıyasla, alternatif yapılar daha düşük pH değerlerinde çökelir. Aljinik asidin nötralizasyonu $pH > 4$ 'te gerçekleşir. Sodyum aljinat, suda çözünür bir aljinat örneğidir [85].

Aljinat kuru bir toz olarak ve özellikle bir çözelti olarak, viskozitenin azalmasıyla birlikte zincir uzunluğunun hızlı bir şekilde azalmasına yol açan bozunmaya maruz kalır. Birçok mikroorganizma aljinatı sindirir. Bir derin dondurucuda, sodyum aljinat, önemli bir bozulma olmaksızın birkaç yıl saklanabilir [85].

Aljinatlar doğada oldukça bol miktarda bulunur. Ticari sodyum aljinatlar genellikle denizdeki kahverengi alglerden üretilir, ancak bazı bakteriler tarafından hücre dışı bir materyal olarak da sentezlenebilirler [85].

Yiyecek ve içecek endüstrisinde aljinatlar, jöle, çikolatalı süt gibi içecekler ve dondurma gibi tatlılar gibi çok çeşitli ürünler için stabilizatör ve koyulaştırıcı olarak kullanılır. Maya hücreleri, etanol üretiminde kullanılmak üzere aljinatlarla kapsüllenir [90].

2.5.2 Pektinler

Pektinler, ağırlıkça en az %65 a-(1→4)-bağlı d-galakturonik asit birimlerinden oluşan yüksek molar kütleli hetero-polisakkaritlerdir.[55] [61] [63] Pektin, ana bileşen olarak D-galakturonik asit ve ardından D-galaktoz ve L-arabinoz ile en az 17 farklı monosakarit türünden oluşur [91].

Esterleşme derecesi (DE), bitki pektininin çeşitli özelliklerini etkileyen önemli bir terimdir ve metanol ile esterlenmiş karboksil grubu yüzdesi olarak tanımlanabilir [91,85]. %50'den fazla esterleşmeye sahip pektinler, yüksek esterlenmiş (HM, yüksek metoksilatlı) %50'den az ester grubuna sahip pektinler ise düşük esterlenmiş pektinler (LM, düşük metoksilatlı) olarak adlandırılır [85,92].

Pektinin glakturonik asit kalıntılarının esterleşme derecesi, pektinin çözünürlüğünü, jelleşme ve film oluşturma özelliklerini etkileyen en önemli parametredir. Esterleşme derecesi, bitki kaynağına, bitkinin ne zaman ve nerede hasat edildiğine ve depolama, izolasyon, saflaştırma ve ekstraksiyon gibi işleme koşullarına göre değişir [92].

Metoksilasyona bağlı olarak pektinler farklı bir hidrofobikliğe sahiptir ve örneğin yüksek metoksillenmiş pektin yüksek oranda hidrofobiktir ve hidrofobik moleküllerle etkileşime girebilir. Bu nedenle pektin, hidrofobik moleküllerle etkileşimde, malzemenin matrikse katılımını iyileştirmede ve kontrollü bir salım profili sağlamada kilit bir rol oynayabilir [91].

Pektinler kalıcı olmayan negatif yüklü moleküllerdir ve bu nedenle polielektrolitler gibi davranırlar ve bunların çözelti özellikleri, pH değişimine ve çözeltideki katyonların varlığına duyarlıdır. Pektin çözeltilerinin en kararlı oldukları pH 3-4'tür [85]. Pektin, düşük pH'da bir molekül kümesi oluşturur, ancak nötr pH'da pektin kümeleri ayrışma eğilimi gösterir ve genişletilmiş bir ağ oluşturur [92]. Pektin, iki değerlikli katyonların varlığında benzersiz jel oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu da onu biyoaktif maddeler için ideal bir taşıyıcı yapar. Jelleşme, ayrıca öncelikle esterleşme derecesi olmak üzere

ham maddenin doğasına ve kalitesine de bağlıdır. Yüksek metoksilli (HM) ve düşük (LM) metoksilli pektinler farklı jelleşme mekanizmalarına sahiptir. HM pektinleri, düşük pH aralığında yalnızca şekerlerin veya diğer yardımcı maddelerin varlığında jelleşir. Jel gücü, pH azaldıkça artar [85].

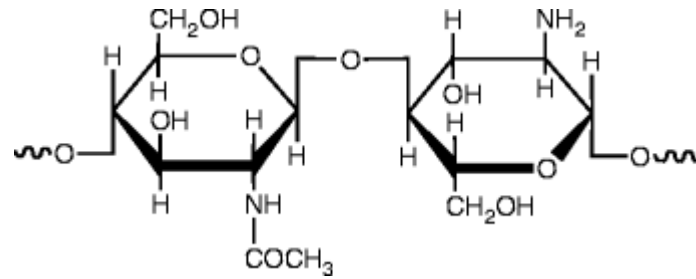
Pektinler, yüksek bitkilerde hücre duvarı için bir tür çimento görevi görür. Meyvelerde değişken miktarlarda ve niteliklerde bulunurlar [85,91]. Pektinler, sıcak sulu mineral asit ile pH 1.5-3 aralığında, ekstrakte edilir [85,91,92].

Pektin, emülsiyon stabilizatörü olması, jelleşme özellikleri ve bağlama yetenekleri gibi çeşitli faydaları olduğu için potansiyel olarak umut verici bir kapsülleme malzemesidir. [63] Aynı zamanda, pektinler güvenli gıda maddeleridir [91].

Pektinin üst gastrointestinal sistemde (GİT) aktif olan proteazlara ve amilazlara dirençli olduğu ve kolonda bulunan çok sayıda mikroorganizma tarafından parçalandığı bilinmektedir [92].

2.5.3 Kitosan

Kitosan, [(1 → 4)-β-bağlı 2-amino-2-deoksi-d-glukoz (Şekil 2.23)] doğada hafif hidrofilik olarak bulunan lineer bir polisakkarittir. [55][57][64] Yengeçler, karidesler ve diğer bazı kabukluların kabukları, kitin (β-(1 → 4)-N-asetil-d-glukozamin) içerir. Bu madde alkali sodyum hidroksit ile reaksiyona girdiğinde kitosan olarak bilinen bir N-deasetilasyon ürünü verir [85,94].



Şekil 2.23 Kitosanın temel kimyasal yapısı, deasetillenmiş (kitosan, sağda) ve asetillenmiş (kitin, solda) zincir birimleri

Bileşimi, asetil-glukozamin birimlerinin fraksiyonu olan asetilasyon derecesi (DA) ile gösterilir. Molekül ağırlığı, kaynağa ve izolasyon teknolojisine bağlıdır, ancak yaklaşık 5×10^5 g/mol değerlerine ulaşabilir [85].

Kitosan, kalıcı olmayan yüklü bir katyonik polielektrolit olarak sınıflandırılabilir. Kitosan pozitif yüklüdür ve asidik ila nötr ortamda çözünür. Yük yoğunluğu ve çözünürlük DA'ya bağlıdır. Sadece %40'ı geçmeyen DA'ya sahip kitosan asidik sulu ortamda çözünür

[85,94]. Kitosan, tripolifosfat ve aljinat ile jeller oluşturur. Ayrıca, çok iyi bir film oluşturma yeteneğine sahiptir [85].

Kitosanın ana kaynağı kitindir. Kitosan (asetillenmiş kitin) tipik olarak eklem bacaklıların ve kabukluların dış iskeletlerinde ve ayrıca mantar hücre duvarlarında bulunur [85,94]. Çok yakın zamanda, mantarlardan ticari izolasyon başlamıştır [85].

Kitosan kaplamanın başlıca avantajları, benzersiz katyonik karakter, yüksek biyoyumluluk, toksik olmama ve biyolojik olarak parçalanabilirliktir; bu nedenle gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanıma oldukça uygundur [93]. Bu polimerler biyolojik olarak parçalanabilir olmanın yanında yenilebilirdir [87]. Kitosan, sert kimyasal yapısı nedeniyle film, jel ve mikrokapsül oluşturmaya uygundur [94].

Kitosanın en önemli gıda uygulamaları, fonksiyonel gıda ürünlerinin üretiminde probiyotik stabilite için kapsülleme materyali olması, biyolojik olarak parçalanabilen filmlerin oluşumu, enzimlerin bağlanması, gıdaların mikrobiyal bozulmadan korunması, besin takviyeleri gibi uygulamalardır [93].

Aktif farmasötik bileşenler, gıda ürünleri, katalizörler, yağlar ve pigmentler gibi farklı tipteki çekirdek malzemeler, kabuk malzemesi olarak kitosan kullanılarak mikrokapsüllenebilir. Kimyasal olarak kitosan, nötr veya bazik ortamda serbest amin grupları içerirken, asidik ortamda protonlanmış aminler oluşur. Bu pH'a duyarlı özellikler, kitosan bazlı bileşikleri kontrollü salım teknolojilerinde uygun hale getirir [94].

3.1 Materyal

Mikrohidrojellerin dış kaplamalarında kullanılan yüksek molekül ağırlıklı (HC) (asetilasyon derecesi DA %91.6, viskozite = 77 cP) ve düşük molekül ağırlıklı (LC) (DA %91.3, pH 4,1'de viskozite = 12 cP) kitosanlar G.T.C Bio Corporation (Quingdao-Çin)'den satın alınmıştır. Sodyum aljinat (Algogel 3001, 300–500 kDa, mannuronik-glukuronik (M/G) oranı 0.5–0.7) [100] (Cargill, Minnesota-ABD), turuncgil pektini (%71 DE ile yüksek metoksi) (Cargill, Minnesota-ABD), Ellajik asit, asetik asit, pepsin (P7012), pankreatin (P7545) ve safra tuzları (P8631) ile asetik asit, Sigma-Aldrich'ten (Steinheim, Almanya) ve CaCl₂ Merck (Darmstadt-Almanya)'den temin edilmiştir. Kullanılan diğer bütün kimyasallar analitik saflıktadır. Metanol (Tekkim, İstanbul-Türkiye), etanol (Tekkim, İstanbul-Türkiye), asetonitril (Honeywell, Kuzey Carolina-ABD), dimetil sülfoksit (DMSO) (Tekkim, İstanbul-Türkiye) çeşitli aşamalarda solvent olarak kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Kullanılan Kitosanların Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

Kitosanın moleküler ağırlığı, önceki çalışmamızdaki metoda göre belirlenmiştir. [101] Asetik asit içinde seri olarak seyreltilmiş kitosan çözeltilerinin kayma viskozitesi, çift silindirik bir sistemle (DG-26.7/TEZ 150 P-C) donatılmış rotasyonel bir reometre (MCR 300, Anton Paar, Stuttgart, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür. Kitosanın 0.2M CH₃COOH/ 0.1M CH₃COONa çözeltisi içindeki gerçek viskoziteleri, Huggins ve Kraemer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Wang ve diğerleri 1991; Kasaai ve diğerleri 2000). İndirgenmiş viskozite η_r şu şekilde (3.1) hesaplanmıştır:

$$\eta_r = \frac{\left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1\right)}{c} \quad (3.1)$$

Burada η_r , c polimer konsantrasyonunda kitosan çözeltisinin viskozitesidir ve η_0 , sıvı fazın viskozitesidir. Doğal viskozite ise şu şekilde (3.2) hesaplanmıştır:

$$\eta_i = \frac{\ln\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right)}{c} \quad (3.2)$$

Kitosan çözeltisinin gerçek viskozitesi (η), c sıfıra yaklaşırken c grafiği ile karşılaştırıldığında η_r ve η_i 'nin kesişmesinden elde edilmiştir. Son olarak, kitosanın ortalama molekül ağırlıkları, Mark-Houwink denklemi (3.3) kullanılarak içsel viskozitelerden hesaplanmıştır. (Wang ve diğerleri 1991) [137].

$$[\eta] = KM_w^a \quad (3.3)$$

K (1.424×10^{-3} mL g⁻¹) ve a sabittir (0.96) (Wang ve diğerleri 1991)[137].

3.2.2 Kullanılan Polimerlerin, Besleme Çözeltilerinin Yüzey Yükü (Zeta Potansiyel) ve Viskozite Ölçümleri

Distile su içindeki sodyum aljinat çözeltisinin, sulu asetik asit çözeltisi içindeki LC ve HC'nin zeta potansiyeli, bir Nano ZS Zetasizer cihazı (Malvern Instruments Corp. Malvern, İngiltere) ile belirlenmiştir. Bu amaçla hidrojeller, asetat tamponu ile 100 kat seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekler daha sonra bir partikül elektroforez cihazının (Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) kuvetine koyulmuş ve ζ potansiyeli, uygulanan elektrik alanında hidrojellerin hareket ettiği yön ve hız ölçülerek belirlenmiştir. ζ -potansiyel ölçümleri, numune başına 3 okuma yapılarak, yapılan ölçümlerin ortalama ve standart sapması olarak rapor edilmiştir.[101]

Besleme çözeltilerinin (10 g L^{-1}) reolojik ölçümü, 25 °C'de (MCR302, Anton Paar, North Ryde, Avustralya) bir plaka-plaka sensörüne sahip (çap = 25 mm, boşluk = 1 mm) reometre ile belirlenmiştir. Kesme hızı aralığı 0.1 ile 100 s⁻¹ arasında tutulmuştur. Power Law modeli uygulanmış ve çözeltilerin mutlak viskoziteleri buna göre elde edilmiştir. Numunelerin akış eğrileri, kesme gerilimine karşı kesme hızı verilerinden elde edilmiş ve power-law denkleminde (3.4) uydurulmuştur:

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (3.4)$$

burada σ kayma gerilimidir (Pa), K tutarlılık katsayısıdır (Pa.sn), $\dot{\gamma}$ kayma hızıdır (s⁻¹), n akış davranış indeksidir (boyutsuz). n değerine göre akış davranışları belirlenmektedir.

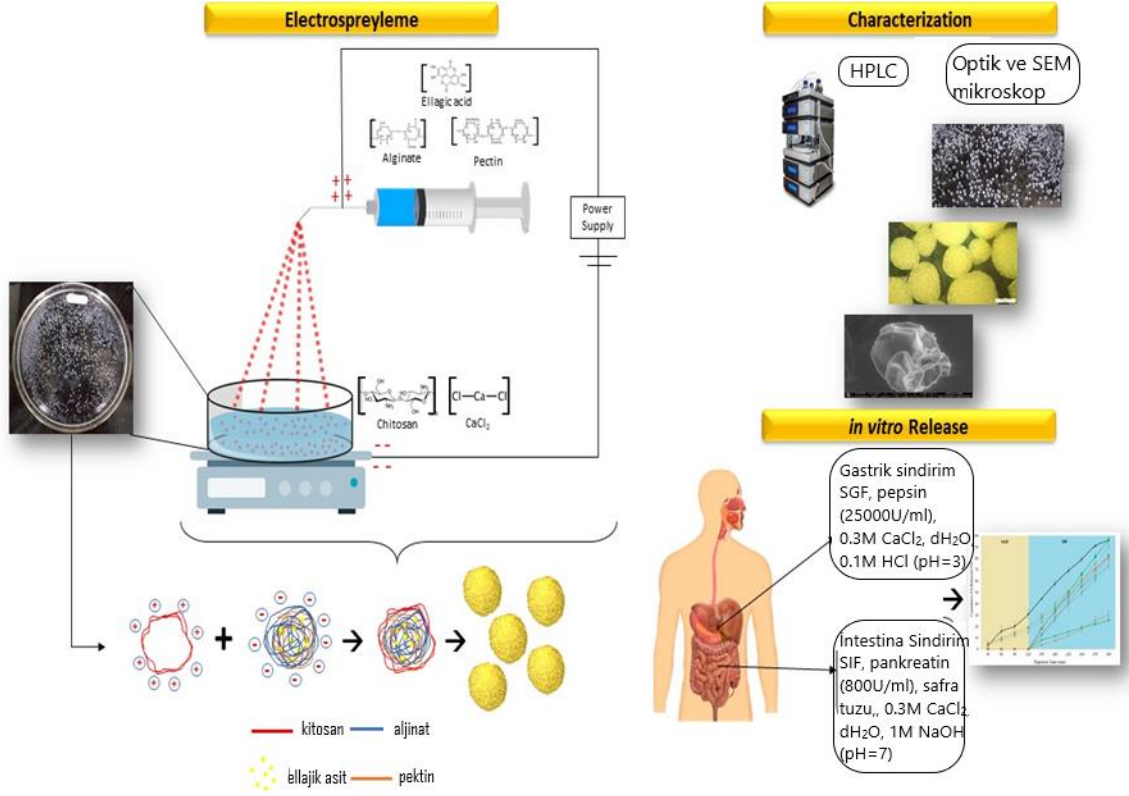
$n < 1$: shear-thinning sistem

$n = 1$: Newtonian sistem

$n > 1$: shear-thickening sistem olmaktadır.

3.2.3 Ellajik Asit (EA) Yüklü Mikrohidrojellerin Üretimi

Bu çalışmada elektropüskürtme ve iyonotropik jelasyon teknikleri bir arada kullanılarak mikrohidrojeller üretilmiştir. Şekil 3.1’de mikrohidrojel üretiminin ve çalışmanın grafiksel özeti verilmiştir.



Şekil 3.1 Mikrohidrojel üretiminin ve çalışmanın grafiksel özeti

Besleme çözeltisi olarak; aljinat: pektin çözeltileri farklı oranlarda kullanılmıştır. Bu amaçla, %1 (a:h) konsantrasyonda distile suda çözülerek hazırlanan aljinat ve pektin çözeltileri, ağırlıkça 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8 ve 0:10 (aljinat:pektin) oranında karıştırılarak besleme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ellajik asit, son hacimdeki miktarı 300 mg/L olacak şekilde besleme çözeltilerine eklenmiştir.

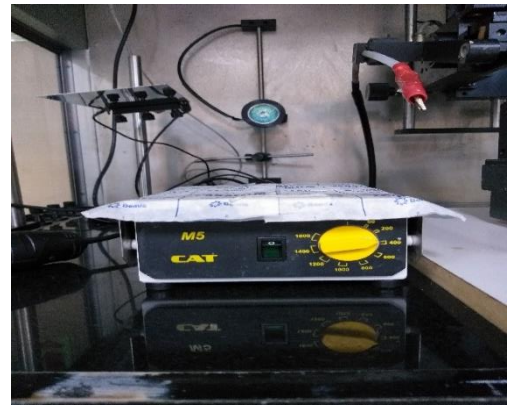
Besleme çözeltisinin püskürtüleceği jelleşme banyo çözeltisi ise CaCl₂ çözeltisi ile kitosan çözeltisinin 27:3 (h:h) oranında karıştırılması ile hazırlanmıştır. %1’lik CaCl₂ çözeltisi distile suda hazırlanmıştır. Bu amaçla 10 g/L konsantrasyonunda CaCl₂ çözeltisi distile suda hazırlanmıştır. Kitosan çözeltisi için LC ve HC olmak üzere iki farklı tür kitosan kullanılmıştır. LC ve HC 5g/L konsantrasyonunda distile suda çözülün asetik asit çözeltisinde hazırlanmıştır. Jelleşme banyo çözeltisinde kitosanın konsantrasyonu 2.5 g/L şeklindedir.

Mikrohidrojel üretim işlemi laboratuvar ölçekli Holmarc Opto Mechatronics Pvt. Ltd. Nano Fiber Electrospinning Unit model no:HO-NFES-0434 elektrodöndürme cihazı (Şekil 3.2) ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Elektrodöndürme cihazı

Hazırlanan farklı kombinasyonlardaki elajik asit yüklenen ve yüklenmeyen besleme çözeltileri şırıngaya çekilmiş ve şırınga cihazın pompa kısmına (Şekil 3.3) yerleştirilmiştir.

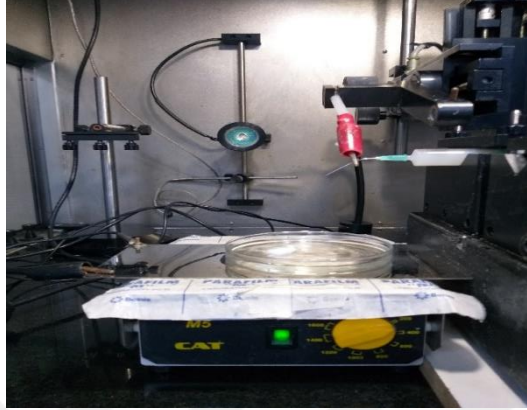


Şekil 3.3 Besleme çözeltisinin cihaza yerleştirilmesi

Cihazın içerisine bir adet manyetik karıştırıcı konulmuştur (Şekil 3.4). Manyetik karıştırıcının üzerine toplayıcı plaka yerleştirilmiştir. Eksi uçlu elektrot şırınganın metal

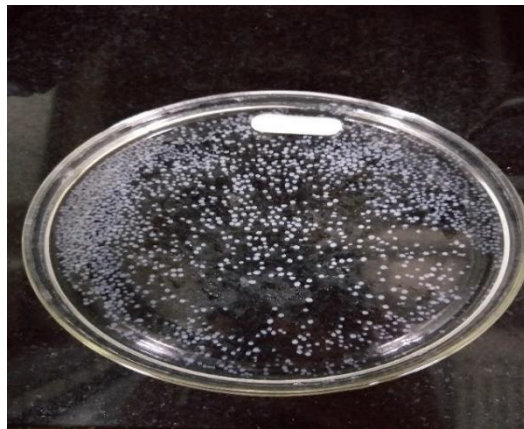
ucuna, artı uçlu elektrot toplayıcı plakaya tutturulmuş böylece plaka ve şırınga arasında bir elektriksel alan oluşturulmuştur.

Hazırlanan banyo çözeltisi manyetik karıştırıcının üzerine konulmuş ve işlem sırasında devamlı karıştırma sağlanarak partiküllerin aynı yerde birikmesi ve birbirine yapışmaları engellenmiştir.



Şekil 3.4 Banyo çözeltisinin manyetik karıştırıcı ile karıştırılması

Elektropüskürtme ünitesinde, yapılan denemelerden sonra mikrohidrojel üretimine izin veren çalışma koşulları şu şekilde belirlenmiştir: voltaj 15 kV; akım 3 μ A; besleme hızı 1 mL sa^{-1} , şırınga ucu (21G) ile toplayıcı banyo arasındaki mesafe 10 cm. Numuneler (Şekil 3.5) 10 dakika toplama solüsyonunda bekletilmiş, daha sonra filtre yardımıyla süzölmüş, distile su ile yıkanmış ve analizler için +4 C'de saklanmıştır. Eğer aksi şekilde belirtilmemiş ise tüm analizler bu şekilde hazırlanan ve saklanan mikrohidrojellerde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5 Elektropüskürtme ile üretilmiş banyo çözeltisi içerisinde bekletilen mikrohidrojeller

3.2.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin (%EE) Belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için mikrohijroellerin parçalanması ve ellajik asitin açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu amaçla, hijroeller bir saat boyunca çalkalamalı bir inkübatörde sodyum sitrat-DMSO-metanol (1:1:1, h:h:h) solüsyonu ile karıştırılmıştır. Ardından 7800 x g'de 30 dak.boyunca +4°C'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst faz, 0.22 µm'lik bir membran filtreden süzölmüş ve bir ters faz-C18 kolonuna (ACE5-C18, 250 x 4.6 mm x 5 µm, Apex Scientific) enjekte edilmiştir. EA konsantrasyonu, bir SPD20A diyot dizi detektörüne (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) bağılı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi (LC-20 AD pompası, SIL-20A HT otomatik numune alıcısı, CTO-10ASVP kolon fırını, DGU-20A5R gaz giderici ve CMB-20A iletişim veri yolu modöülü) kullanılarak belirlenmiştir. Mobil faz olarak asetonitril ve ultra saf su (%0.1 asetik asit içeren) karışımından (1:4 h:h) oluşun izokratik bir elüsyon sistemi kullanılmıştır ve akış hızı 1.0 mL dak⁻¹ dır. Kolon sıcaklığı 40°C, algılama dalga boyu 254 nm ve toplam analiz süresi 15 dak'dır. Bilinen miktarda EA, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözöndürölerek stok çözeltisi hazırlanmış, 6.25–100 µg/mL konsantrasyonunda dilüsyonlar DMSO:metanol (1:1, h:h) çözeltisinde hazırlanmış ve EA kalibrasyon eğrisi (R²=0.99) hazırlanmıştır. Üst fazda analizlenen EA miktarının başlangıçta teorik olarak hijroellere yüklenen EA miktarına oranı ile EE% değeri (3.5) hesaplanmıştır:

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği, (\%EE)} = \frac{\text{Salınan EA'nın kütlesi}}{\text{Başlangıçtaki EA'nın kütlesi}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.5 Mikrohijroellerin Parçacık Boyutu Ve Morfolojisi

Jelleşme banyosundan toplanan kitosan ile kaplanmamış ve kaplanmış aljinat-pektin mikrohijroellerin şekli ve boyutu optik bir mikroskopta (Olympus CKX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) incelenmiştir. En az 50 adet mikrohijrojel üzerinden yapılan ölçömler sonrası ImageJ yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitöleri, ABD) kullanılarak ortalama boyut hesaplanmıştır.

Örneklerin yüzey morfolojisi SEM (FEI Quanta 450 FEG, Graz, Avusturya) ile incelenmiştir. Mikrohijroeller süzölmüş, bir kağıt havlu ile yüzeylerindeki su uzaklaştırılmıştır ve 1 saat boyunca oda koşullarında bekletilmiştir. Daha sonra çift taraflı yapışkan bant ile metalik uçlara sabitlenmiş ve 40 mA akım yoğunluğu kullanılarak 40 s için vakum altında ince bir altın tabakasıyla püskürtölerek kaplanmıştır (Agar Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific, Stansted, UK). Mikrohijroellerin morfolojisi,

500X ila 5000X arasında değişen büyütmelelerde, 6.5 mm mesafe ve 10 kV hızlanma voltajında düşük vakum altında analiz edilmiştir.

3.2.6 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi

EA, polisakkaritler ve mikropartiküllerin FTIR spektrumları, zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR; Bruker Tensor 27, Karlsruhe, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Mikrohidrojeller bir çeker ocak altında gece boyunca kurutulmuş ve analiz öncesi bir havan tokmağı ile öğütülerek toz hale getirilmiştir. Tüm spektrumlar 600 ile 4000 cm^{-1} arasında 2 cm^{-1} çözünürlükte kaydedilmiştir. Örneklerle aynı koşulda, havaya ait arkaplan spektrumu da alınmıştır.

3.2.7 Mikrohidrojellerin Jel Kuvvetleri

Jel kuvveti ölçüm metodu [15] aşağıdaki gibi modifiye edilmiştir. Tek eksenli kompresyon testleri, 5 mm silindirik prob ve 5 kg yük hücresi ile bir TA-XT Plus tekstür analiz cihazında (Stable Micro Systems, Godalming, UK) gerçekleştirilmiştir. Analiz için mikrohidrojeller, 100 μL şişe hacmine (10 mm çap x 3 mm yükseklik) karşılık gelen seviyeden daha az olmayacak şekilde 2 mL'lik bir cam şişeye (10 mm çap x 31 mm yükseklik) yerleştirilmiştir. Hidrojeller 1 mm/s hızında başlangıç yüksekliklerinin %70'ine kadar sıkıştırılmıştır ve sonuçlar kuvvet (g) cinsinden verilmiştir. Sıkıştırma için harcanan maksimum kuvvet, prob tarafından sıkıştırılan mikrohidrojellerin maksimum gücünü temsil eder, bu da mikrohidrojellerin sertliğini gösterir. Bu ölçümler, mikrohidrojeller hazırlandıktan hemen sonra ve üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.8 Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Koşulları Altında Mikrohidrojellerden EA'nın İn Vitro Salınımı

Mikrohidrojellerde enkapsüle EA üzerinde gastrointestinal sindirimin etkisi, in vitro sindirim prosedürü ile belirlenmiştir.[102] Deneyden önce simüle edilmiş sindirim sıvılarının (STS: simüle edilmiş tükürük sıvısı, SGS: simüle edilmiş gastrik sıvı, SBS: simüle edilmiş bağırsak sıvısı) stok çözeltileri Minekus vd. [102] tarafından tarif edilen prosedüre göre hazırlanmış ve 37°C'ye ısıtılmıştır. Ağız, mide ve bağırsak enzimleri de bu çözeltilerle hazırlanmıştır. Daha sonra üretilen mikrohidrojellerden 0.5g örnek tartılmıştır. İlk önce ağız ortamını oluşturmak için bu örneklerle tükürük sıvısı, ağız enzimi (α -amilaz) ve CaCl_2 eklenmiştir ve pH 7'ye ayarlanmıştır. 37 °C'de 2 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mide ortamı oluşturmak için mide sıvısı, mide enzimi (pepsin) ve tekrar CaCl_2 eklenmiş ve hidroklorik asit ile pH 3'e

ayarlanmıştır. Bu ortamda örnekler 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak bağırsak ortamı için bağırsak sıvısı, bağırsak enzimi (pankreatin), safra sıvısı ve CaCl₂ eklenmiş pH NaOH ile 7'ye ayarlanmıştır. Bağırsak ortamında 37°C'de 2 saat inkübasyon yapılmıştır. Kontrollü salım analizi için sindirimin her adımında (ağız sonrası, mide ve bağırsak ortamındayken her yarım saatte bir ve mide ve bağırsak sonunda) 0.5ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler santrifüj edilmiştir. Alınan örneklerle 0.5ml dmsö/metanol çözeltisi eklenip 0.22 µm'lik filtreden süzölerek hplc viyallerine alınmıştır. Salınan EA, 3.2.4'te koşulları belirtilmiş HPLC ölçüm yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. % Kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve veriler grafik halinde sunulmuştur.

3.2.9 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz SPSS Statistics Software (IBM version 20, Armonk, NY, USA) ile yapılmıştır. Sonuçlar, üç tekrarın ortalama ± standart sapma değerleri olarak sunulmuştur. Ortalama değerler arasındaki farklar, Tukey'in post hoc testinin ardından tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. P < 0.05 ise farklılıklar anlamlı kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Kitosanların Molekül Ağırlıkları

Kitosanların ortalama molekül ağırlığı Huggins ve Kramer eşitliğine göre hesaplanmıştır ve sırasıyla yüksek molekül ağırlıklı kitosan (HC) için 392 ve 345 kDa, düşük molekül ağırlıklı kitosan için (LC) ise, 33 ve 55 kDa olarak hesaplanmıştır. (Tablo 4.1)

4.2 Kullanılan Polimerlerin, Besleme Çözeltilerinin Yüzey Yükü (Zeta Potansiyel) ve Viskozite Ölçümleri

Çalışmamızda besleme çözeltisi polimeri olarak kullanılan aljinat, pektin ve bunların karışımlarının, ve kaplama polimeri olan kitosanların viskozite değerleri ve ayrıca zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1’de, kesme hızının kesme gerilimine karşılık gelen değişimi ise Şekil 4.1’de verilmiştir. Tüm polimerler Newtonian akış davranışı göstermişlerdir.

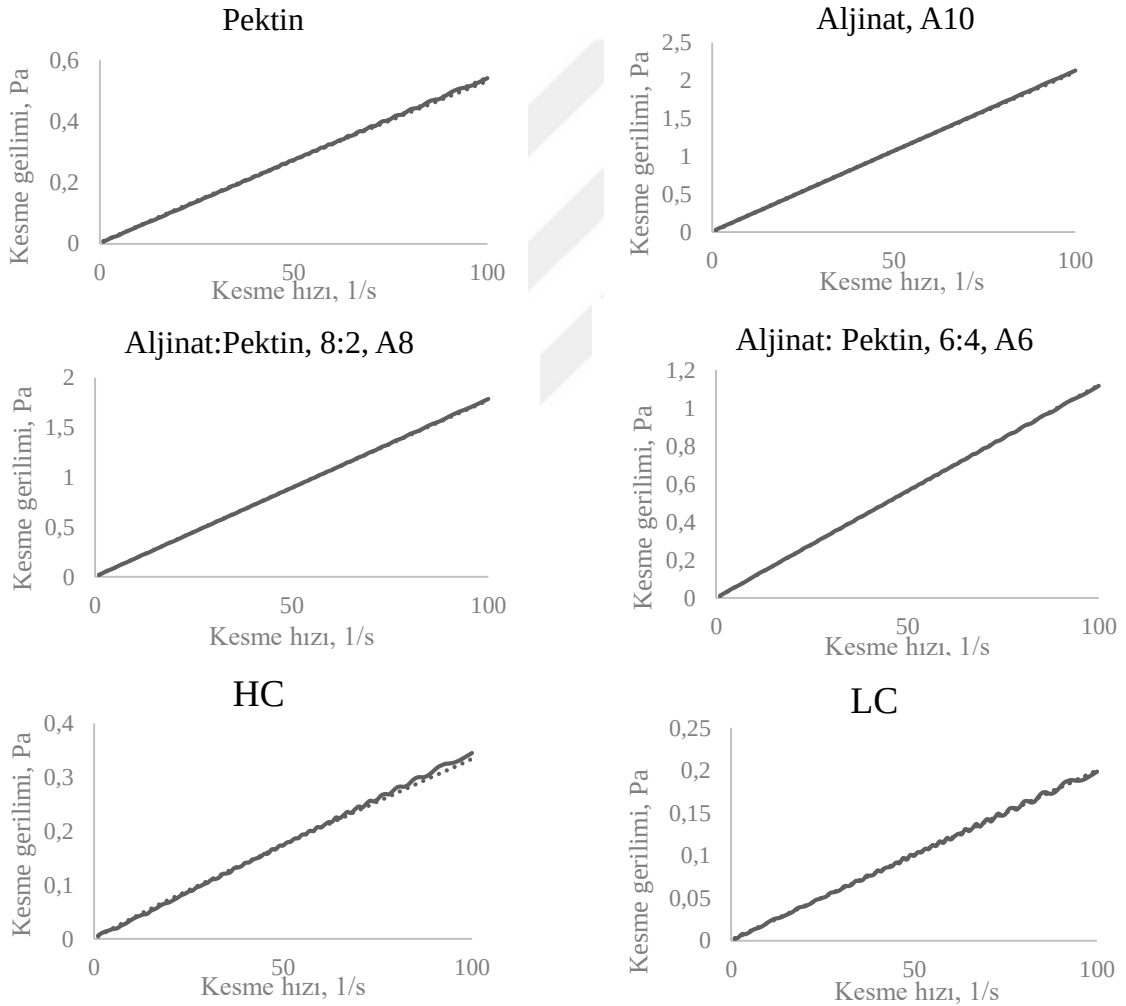
Tablo 4.1 Viskozite, zeta potansiyeli ve çalışmada kullanılan polimerlerin ortalama molekül ağırlığı değerleri

Örnekle r	Kons. (%)	Model Tipi	Akış		R Sabiti	Viskozite (Pa.s)	Zeta potensi yel (mV)	Ort molekül	
			Tipi	Model Eşitliği				ağırlığı (kDa)	
								Huggins	Kramer
Polimerler								Eşitliği	Eşitliği
HC	1	Power Law	Newtonia n	$y = 0.0044x^{0.9389}$	0.9993	0.0044	26.23±5 .4	391.89	344.81
LC	1	Power Law	Newtonia n	$y = 0.0021x^{0.988}$	0.9992	0.0021	35.23±2 .9	32.52	54.59
Aljinat	1	Power Law	Newtonia n	$y = 0.0233x^{0.9784}$	0.9999	0.0233	-		
	51.5±2. 1								
Pektin	1	Power Law	Newtonia n	$y = 0.0064x^{0.9597}$	0.9998	0.0064	- 24.8±0. 4		

Tablo 4.1 Viskozite, zeta potansiyeli ve çalışmada kullanılan polimerlerin ortalama molekül ağırlığı değerleri (devamı)

Polimer karışımları

A10	1	Power Law	Newtonian	$y = 0.0203x^{0.9882}$	1	0.0203
A8	1	Power Law	Newtonian	$y = 0.0188x^{0.9875}$	1	0.0188
A6	1	Power Law	Newtonian	$y = 0.0115x^{0.9952}$	1	0.0115



Şekil 4.1 Mikrohidrojel üretimi için kullanılan polisakkarit ve polisakkarit karışımlarının viskozite eğrileri

Çalışmamızda besleme solüsyonunun viskozitesi, aljinata pektin ilave edilmesiyle azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda çözeltideki düşük aljinat konsantrasyonu ve viskozite değerlerinin genel olarak daha küçük partiküller üreteceği belirtilmesine rağmen,

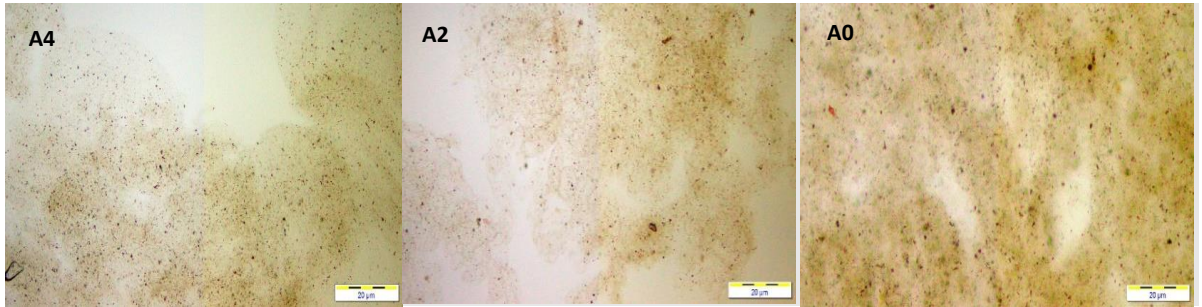
[103,104] aynı zamanda 10 ila 30 g/L aljinat konsantrasyonları arasında, viskozitenin partiküllerin çapı üzerinde 2.93 ile 3.11 mm arasında değişen sınırlı bir etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir [105].

Ayrıca, elektropüskürtülmüş parçacıkların çapının viskozite ile beraber iğne boyutundan da etkilendiği bildirilmiştir. Örneğin, aljinat konsantrasyonu %1'den %5'e yükseltildiğinde, küçük çaplı iğne (26 G) kullanıldığı zaman partikül çapı artarken, daha büyük çaplı iğne (18 ve 21 G) kullanıldığında ise aljinat konsantrasyonu ve besleme çözeltisi viskozitesinin parçacık çapı üzerinde çok az etkisi olduğu veya hiç etkisi olmadığı belirtilmiştir[106].

Polimerlerin zeta potansiyel değerleri ise, anyonik polisakkaritlerden olan aljinat için -51.5 mV, pektin için -24.8 mV değerindedir. Katyonik polisakkarit olan kitosan için ise LC için 35.23 mV, HC için ise 26.23 mV değerindedir. Jelleşme banyosunda bulunan pozitif yüklü kitosan, negatif yüklü mikrohijel yüzeyi ile elektrostatik olarak bağlanma gerçekleştirmektedir.

4.3 Mikrohijellerin Parçacık Boyutu ve Morfolojisi

Denemelerimiz sonrasında mikrohijel üretimi yapılabilen aljinat:pektin karışımları 10:0, 8:2 ve 6:4 olduğu için sadece bu karışımlar değerlendirilmiştir. Aljinatın miktarının daha düşük olduğu koşullarda hijel üretimi gerçekleştirilememiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Jelleşme banyosundan toplanan yapıların optik mikroskop görüntüleri. A4, A2 ve A0, sırasıyla 4:6, 2:8 ve 0:10 aljinat:pektin oranına sahip formülasyonlardır.

Kaplanmamış mikrohijellerde, besleme çözeltisine %40'a (a/a) kadar pektin eklenmesi, saf aljinat ile hazırlanan hijellere kıyasla küreselliği değiştirmemiş (Şekil 4.3.), ancak daha büyük parçacık oluşumları gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Besleme çözeltisinin reolojik özelliklerinin ve jelleşme özelliklerinin, oluşan hijellerin boyutu ve şekli üzerinde bir etkiye sahip olacağı daha önce yapılan çalışmalarda

bildirilmiştir. Madziva, Kailasapathy ve Phillips (2005)' in çalışmasında, aljinata yüksek pektin oranının eklenmesi de partiküllerin küresel şeklinin kaybına neden olduğu bildirilmiştir. [118]

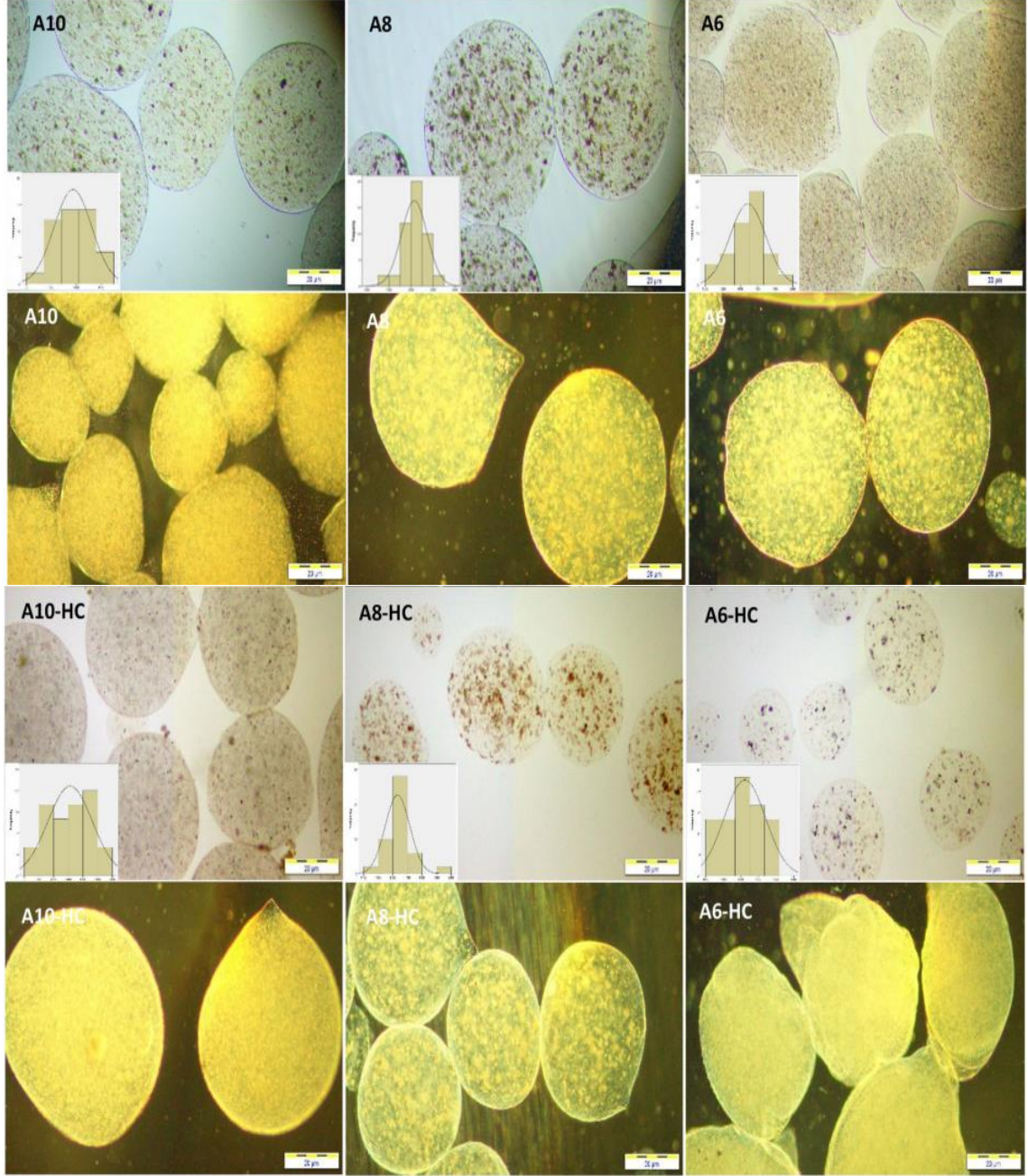
Yapılan bir çalışmada aljinat-pektin oranının parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı üzerindeki etkisi Rosin-Rammler ampirik dağılımı ve log-olasılık modeli kullanılarak araştırıldığında, pektin ilavesiyle mikrohijojellerin boyutunun arttığı bulunmuştur [107]. Besleme solüsyonu %40 pektin içeriğinde, parçacıkların boyutları (1.48 ± 0.2 mm), %20 pektin içerenlerden daha düşük, ancak yine de sadece aljinat ile üretilen (1.18 ± 0.14 mm) mikrohijojellerden daha büyük olmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Hidrojellerin partikül boyutu, enkapsülasyon etkinliği ve jel kuvveti

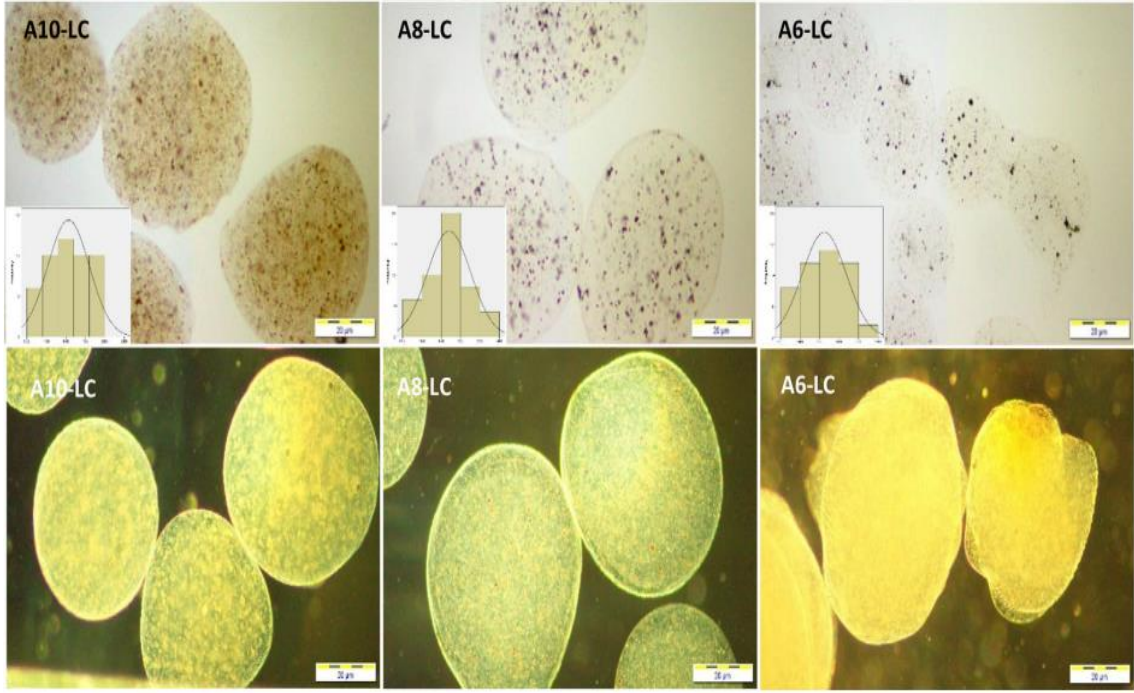
Örnekler	Boyut (mm)	Enkapsülasyon etkinliği (%EE)	Jel kuvveti (force, g)
<i>Kaplanmamış hidrojeller</i>			
A10	1.18 ± 0.15^f	$69.85 \pm 5.54^{b,c}$	26.40 ± 1.94^a
A8	2.08 ± 0.29^a	$55.72 \pm 3.89^{d,e}$	$16.79 \pm 0.72^{c,d}$
A6	1.48 ± 0.20^d	49.53 ± 4.67^e	14.70 ± 0.52^d
<i>HC ile kaplanmış hidrojeller</i>			
A10-HC	$1.41 \pm 0.28^{d,e}$	74.48 ± 0.96^c	22.77 ± 1.20^b
A8-HC	1.64 ± 0.80^c	73.03 ± 0.47^c	18.43 ± 1.38^c
A6-HC	1.32 ± 0.11^e	$61.78 \pm 0.40^{c,d}$	18.45 ± 0.91^c
<i>LC ile kaplanmış hidrojeller</i>			
A10-LC	1.62 ± 0.20^c	86.50 ± 0.80^a	11.22 ± 0.074^e
A8-LC	1.88 ± 0.22^b	76.00 ± 1.51^b	15.31 ± 1.12^d
A6-LC	1.64 ± 0.22^c	$69.15 \pm 0.59^{b,c}$	14.57 ± 0.80^d

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma (n = 3) olarak sunulmuştur. Aynı sütunda farklı harflere sahip ortalamalar önemli ölçüde farklıdır (p < 0.05). A10, A8 ve A6, sırasıyla 10: 0, 8:2 ve 6:4 (a:a) aljinat: pektin oranına sahip formülasyonlardır. LC ve HC, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan kaplamaya atıfta bulunur.

A10 (saf aljinat) ve A6 (aljinat: pektin, 6:4) formülasyonunda kitosan ile hidrojellerin kaplanması, düşük molekül ağırlıklı kitosan (LC) kullanıldığında boyutları arttırmıştır, ancak A8 formülasyonu için (aljinat: pektin, 8:2), boyut, kaplanmamış numuneye kıyasla küçültülmüştür. LC'ye kıyasla, daha yüksek molekül ağırlıklı kitosan (HC) ile kaplama, boyutta daha az artışa ve daha kompakt yapılara neden olmuştur (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Hidrojellerin optik mikroskop görüntüleri (farklı faz kontrast kondansatörlü (ph 1, ph 2), 40x büyötmeye sahip ve ölçek çubuğu 20 µm'yi gösterir). A10, A8 ve A6, sırasıyla 10:0, 8:2 ve 6:4 aljinat:pektin oranlarına sahip formülasyonlardır. LC ve HC, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan kaplamayı ifade eder.

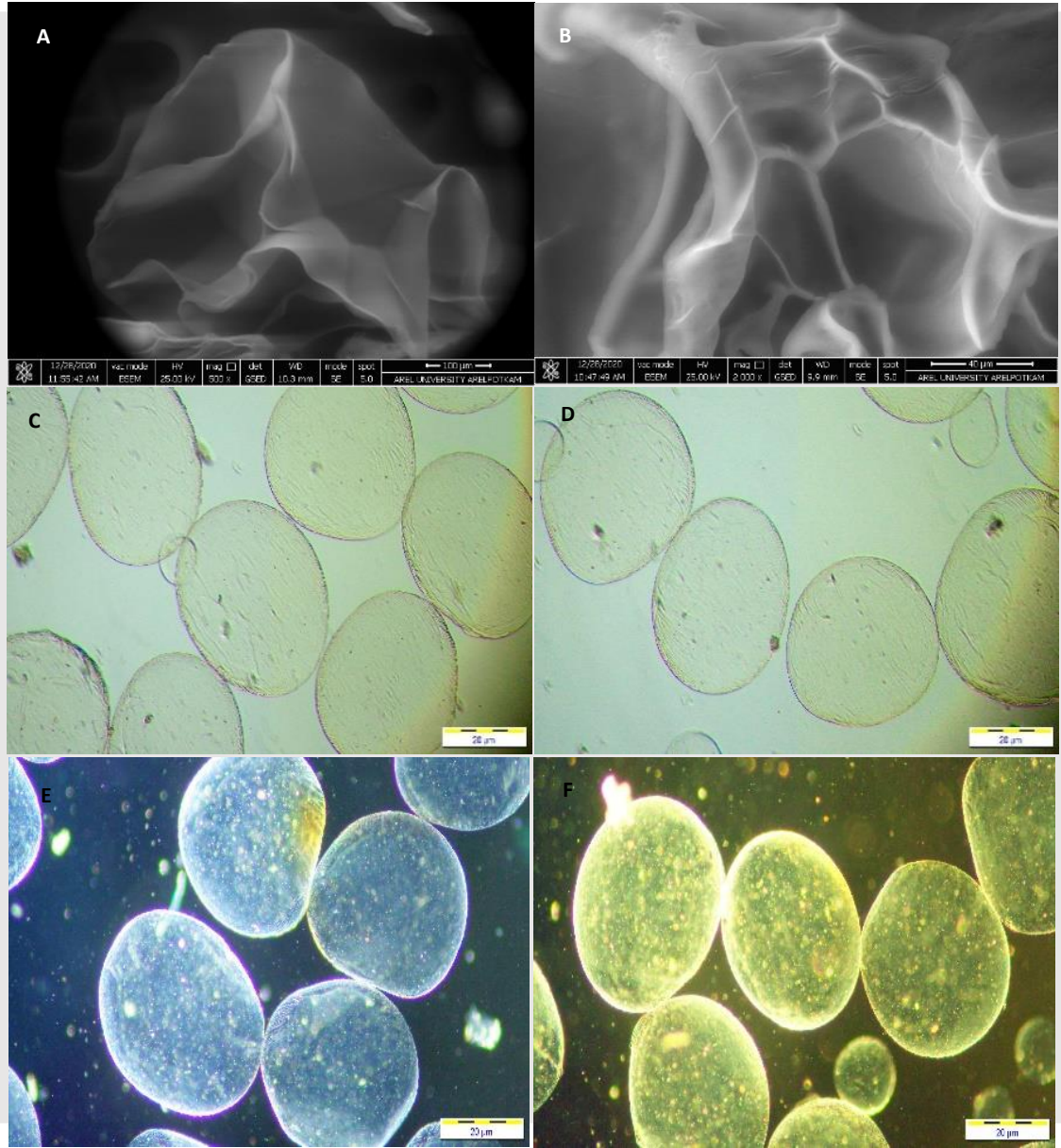


Şekil 4.3 Hidrojellerin optik mikroskop görüntüleri (farklı faz kontrast kondansatörlü (ph 1, ph 2), 40x büyötmeye sahip ve ölçek çubuğu 20 µm'yi gösterir). A10, A8 ve A6, sırasıyla 10:0, 8:2 ve 6:4 aljinat:pektin oranlarına sahip formölasyonlardır. LC ve HC, düşük ve yüksek moleköler ağırlıklı kitosan kaplamayı ifade eder. (devamı)

Karışık jellerdeki pektin ve aljinat arasındaki etkileşimler, aljinatın poli-guluronik blokları ile pektinin metil ester bölgelerinin sert-kırılgan olmayan bantlar oluşturan heterojen bir birleşimi olarak tarif edilmiştir. Kalsiyum iyonlarının pektin ve aljinata bağlanma davranışlarının, yapısal etkileri farklı olur ve dolayısıyla oluşan mikrohijellerin de özellikleri üzerinde farklı etkileri olabilir [108]. Örneğin galakturonik asit kalıntılarının esterleşmiş formda olduğu yüksek metoksi pektinde agregasyon, esas olarak ester metil grupları ve hidrojen bağının spesifik olmayan hidrofobik etkileşimlerinin bir kombinasyonu sonucu oluşurken, düşük metoksi pektin ve aljinatta ise agregasyon, Ca iyonları ile bağlanma sonrası yumurta kutusu modelinin modifiye olması şeklindedir [109]. Bu nedenle, bizim çalışmamızda besleme çözeltisindeki daha düşük miktarda aljinat, daha az çapraz bağlantı noktasına işaret eder ve bu durum daha büyük boyutta mikrohijel oluşması ve daha gevşek bir yapı oluşmasına sebep olmuş olabilir. Bu durum artan pektin konsantrasyonu ile azalan jel kuvveti arasındaki ilişkiyi de açıklamaktadır. Ayrıca, olası kalsiyum pektinat ağının zayıf mekanik stabilitesinin aljinat-pektin jeli karışık mikrohijellerin boyutunu artıracığı bildirilmiştir [110].

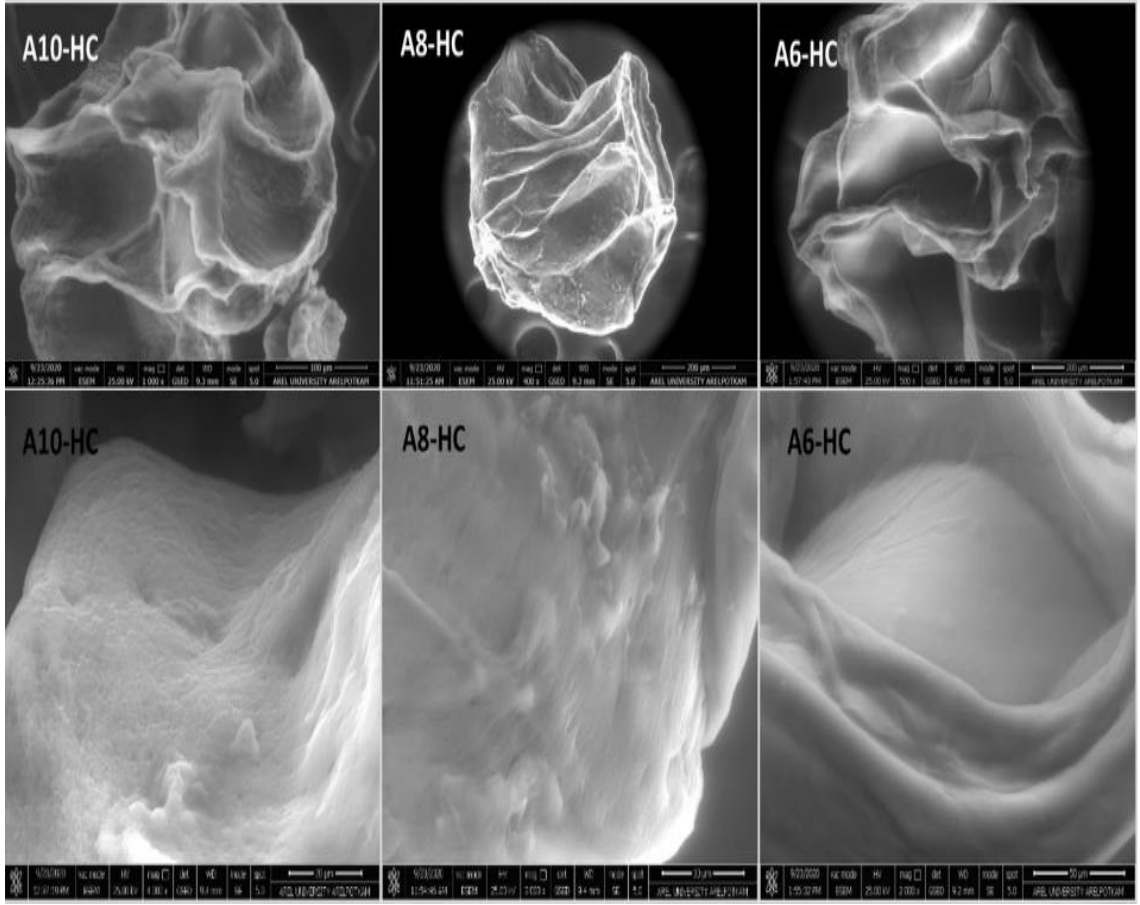
Jelleşme banyosunda bulunan kitosan ve kalsiyum tuzunun bir arada olması, aljinatın Ca iyonları ile jelleşmesi ve kitosanla çökelme reaksiyonu ile bir rekabet başlayabileceği ve bu durumun daha gözenekli jellerin oluşumuna yol açabileceği bildirilmiştir. Kitosanın bağlanması, kitosanın molekül ağırlığı azaldıkça artmaktadır ve daha fazla gözenekli yüzeyler kitosanın difüzyonunu arttırmaktadır [111]. Bizim örneklerimizde, sadece aljinatın kullanıldığı A10 formülasyonunda mikrohijroellerin boyutları, LC veya HC ile kaplanmasıyla beraber artmıştır. Bununla birlikte, aljinat-pektin taneciklerinde ise, kitosan kaplaması ile boyut azalmıştır. Saf aljinat kürecikleri ile karşılaştırıldığında, pektin ilavesi ile daha büyük gözenekli yüzeyler üretilebilir. %EE değerlerini incelediğimizde (Tablo 4.2) pektin ilavesi ile daha düşük %EE değerlerinin gözlenmesi bunun sonucu olabilir, kürecik içerisine alınan EA'nın yüksek porozlu yüzey dolayısıyla hızla jelleşme banyosuna salınmasına sebep olmuş olabilir. Diğer yandan, daha fazla gözenekli yüzeyler sayesinde, jelleşme banyosunda çözünmüş olan kitosan küreciğinin çekirdeğine doğru daha fazla difüze edebilir ve aljinat ile interaksiyona girerek ve boyutun artmamasına sebep olmuş olabilir. Yüzeyin kitosanla kaplanması ile de gözenekli yapının azalması ve tüm örneklerde %EE değerinin artması söz konusudur. Bu durum, yani kitosanın kürecik içerisinde difüze etmesi, aljinat ve pektinle daha fazla bağlanma gerçekleşmesi EA için enkapsüle edilebilmesi için daha az hacim olmasına da sebep olabilir ve bu durum A10-HC ve A-10 LC örneklerine göre pektin içerenlerde daha düşük %EE değeri gözlenmesini açıklayabilir.

EA çökeltilerinin varlığı, Şekil 4.3'te optik mikroskop görüntülerinde kahverengi noktalar olarak görülebilirken, Şekil 4.4'te yani EA içermeyen mikrohijroellerin optik mikroskop görüntüleri şeffaftır. Yine Şekil 4.5'te SEM görüntülerinde EA varlığı gözlemlenirken (beyaz oklar), Şekil 4.4'te EA içermeyen hidroellerin morfolojilerinde bu çıkıntılar gözlenmemiştir.

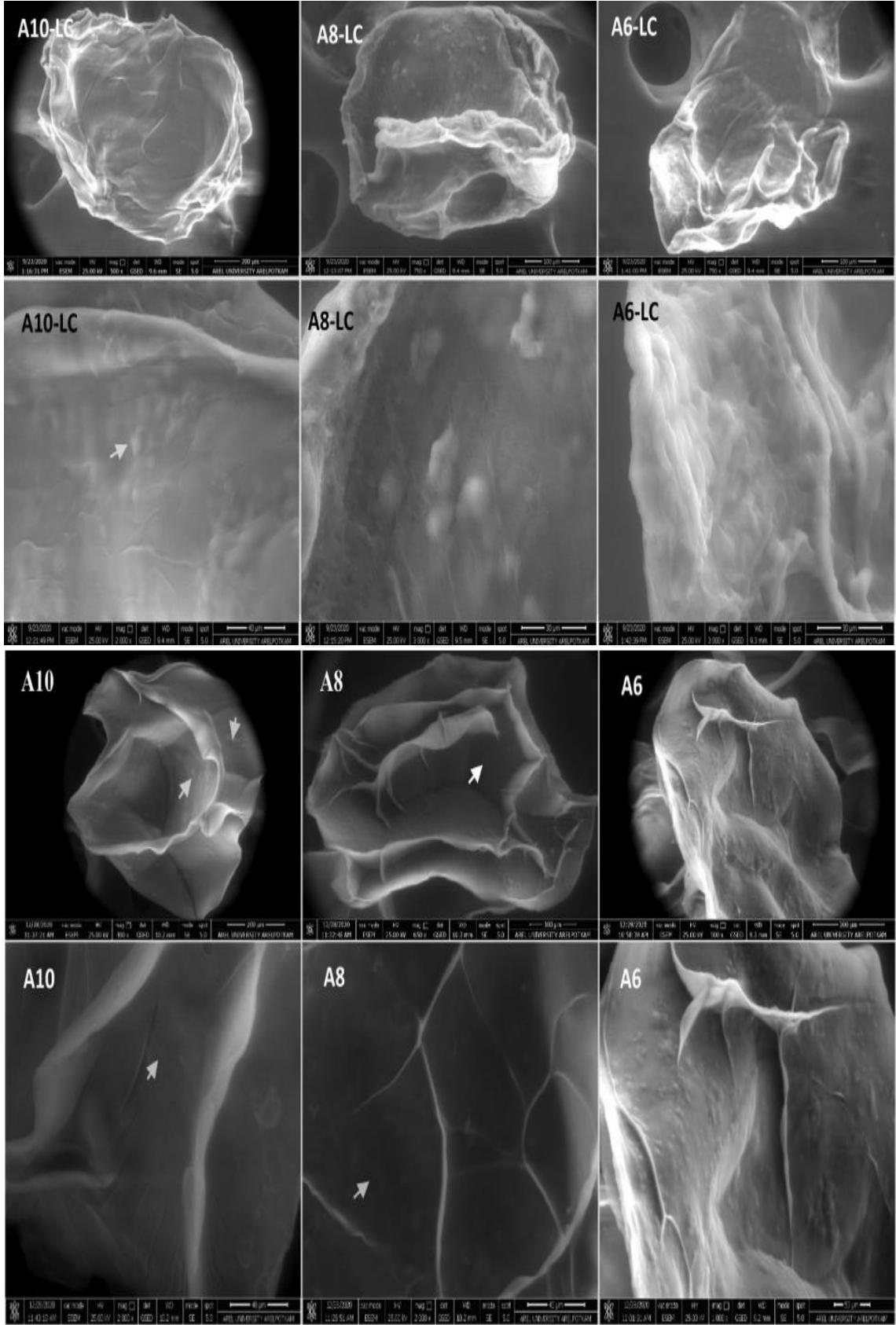


Şekil 4.4 Ellajik asit içermeyen hidrojellerin a, b) SEM görüntüleri, c, d, e, f) optik mikroskop görüntüleri (farklı faz kontrast kondansatörlü (ph1, ph2), 40X büyütme ve 20 µm'yi gösteren ölçek çubuğu)

SEM analizi sırasında ve örneklerin hazırlanmasında kullanılan düşük vakum, yüksek miktarda su içeren küreciklerimizin yapılarındaki düzensiz ve patlamış görüntülere sebep olmuş olabilir (Şekil 4.5). Literatürde yapılan çalışmalarda genelde, mikrohijrojeller SEM görüntülemeyden önce kurutulmuştur, ancak suyun doğal özelliklerinden dolayı dondurularak kurutulmuş mikrohijrojellerde [104] veya sıvı nitrojene batırılmış ve sonrasında dondurularak kurutulmuş [112] mikrohijrojellerin yapılarında da geniş ölçüde benzer şekilde büzülme ve çökmeler gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5 Hidrojellerin SEM görüntüleri. A10, A8 ve A6, sırasıyla 10:0, 8:2 ve 6:4 aljinat:pektin oranına sahip formülasyonlardır. LC ve HC, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan kaplamayı ifade eder.



Şekil 4.5 Hidrojellerin SEM görüntüleri. A10, A8 ve A6, sırasıyla 10:0, 8:2 ve 6:4 aljinat:pektin oranına sahip formülasyonlardır. LC ve HC, düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan kaplamayı ifade eder (devamı).

SEM tekniğinin kısıtlamalarından birinin, daha iyi görselleştirme sağlamak için vakuma dayanıklı numunelere bağımlılık olduğu bildirilmiştir [113]. Bu nedenle, SEM tekniği, yüksek su içeriğine sahip mikrohijroellerin orijinal yüzeyinin ve yapısının görüntülerini sağlamak için uygun teknik olmayabilir. Yüksek su içeriğine sahip (%55-95) aljinat mikrohijroellerin orijinal yapısını görüntülemek için kriyo-SEM'in başarılı bir şekilde uygulanabileceği önerilmiştir [114].

Yine de SEM görüntüleri daha yakından incelendiğinde (Şekil 4.5), saf aljinat mikrohijroellerinin pektin-aljinat karışımlarıyla hazırlananlara göre daha pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu, ancak bazı derin çatlaklara sahip olduğu, buna karşın pektin ilavesinin ise daha fazla kırışıklığa ve ancak daha az çatlak oluşuma neden olduğu söylenebilir. Mikrohijroeller kitosan ile kaplandığında ise, tüm örneklerde kırışıklıkların varlığı azalmıştır, bu durumda kitosanla kaplamanın yapıya esneklik kazandırabileceği söylenebilir. Kitosanın varlığı, HC kaplı mikrohijroellerde daha da ayırt edilebilir olan agrege olmuş ve pullanmış yüzeyler oluşturmuştur. Optik mikroskop görüntülerinde (Şekil 4.3) gözlemlenen EA çökeltilerinin varlığı, SEM görüntülerinde de küçük çıkıntılar olarak görülebilmektedir (beyaz oklar).

4.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin (%EE) Belirlenmesi

Besleme çözeltilerinde hijroellerdeki EA'nın %EE'si, aljinat konsantrasyonunun pektin ile değiştirilmesi sonucunda düşmüştür, saf aljinat (A10) ile hazırlanan hijroeller için %EE 69.85 ± 5.54 iken, A6 formülasyonunda %40 pektin ilavesiyle 49.53 ± 4.7 'ye düşmektedir (Tablo 4.2). Başka bir çalışmada, aljinat-pektin jellerinin mikro yapısı transmisyon elektron mikroskobu ile ayrıntılı olarak analiz edildiğinde, pektin içeriğinin artırılmasının yüzeyde küçük açıklıklara sahip daha yoğun ağ bölgeleri ürettiği gözlenmiştir [115]. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda aljinat ve pektin arasındaki zincir-zincir etkileşimleri, çekirdekte EA'yı barındırmak için daha az kullanılabilir alana ve yüzeyde artan gözenekliliğe sebep olmuş olabilir. Bunların sonucunda, bu örneklerde %EE azalmış olabilir. Pektin ilavesi, yapının düzenliliğini azaltmış olabilir, bu da zayıf bir ağ oluşumuna yol açar ve böylece daha kararsız matrisler oluşur [116]. Bu durum, aynı zamanda, daha yüksek miktarlarda pektin ile yapı içinde EA'yı tutamayan daha zayıf bir jel yapısı üretilmesine sebep olabileceğini gösteren dokusal analiz sonuçlarımızla da tutarlıdır.

Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, pektinin aljinat ile kısmen değiştirilmesiyle nane yağının % EE'sinin azaldığı, [117] ancak başka bir çalışmada ise aljinat-pektin jellerine

pektin ilavesiyle folik asidin % EE'sinin arttığı bildirilmiştir [118]. Farklılıklar pektinin özellikleri ve jel oluşturma davranışları ile ilgili olabilir. Çalışmamızda yüksek metoksi pektin kullanılırken pektinin ilavesiyle % EE'nin arttığı örneklerin olduğu çalışmalarda düşük metoksi pektin kullanılmıştır.

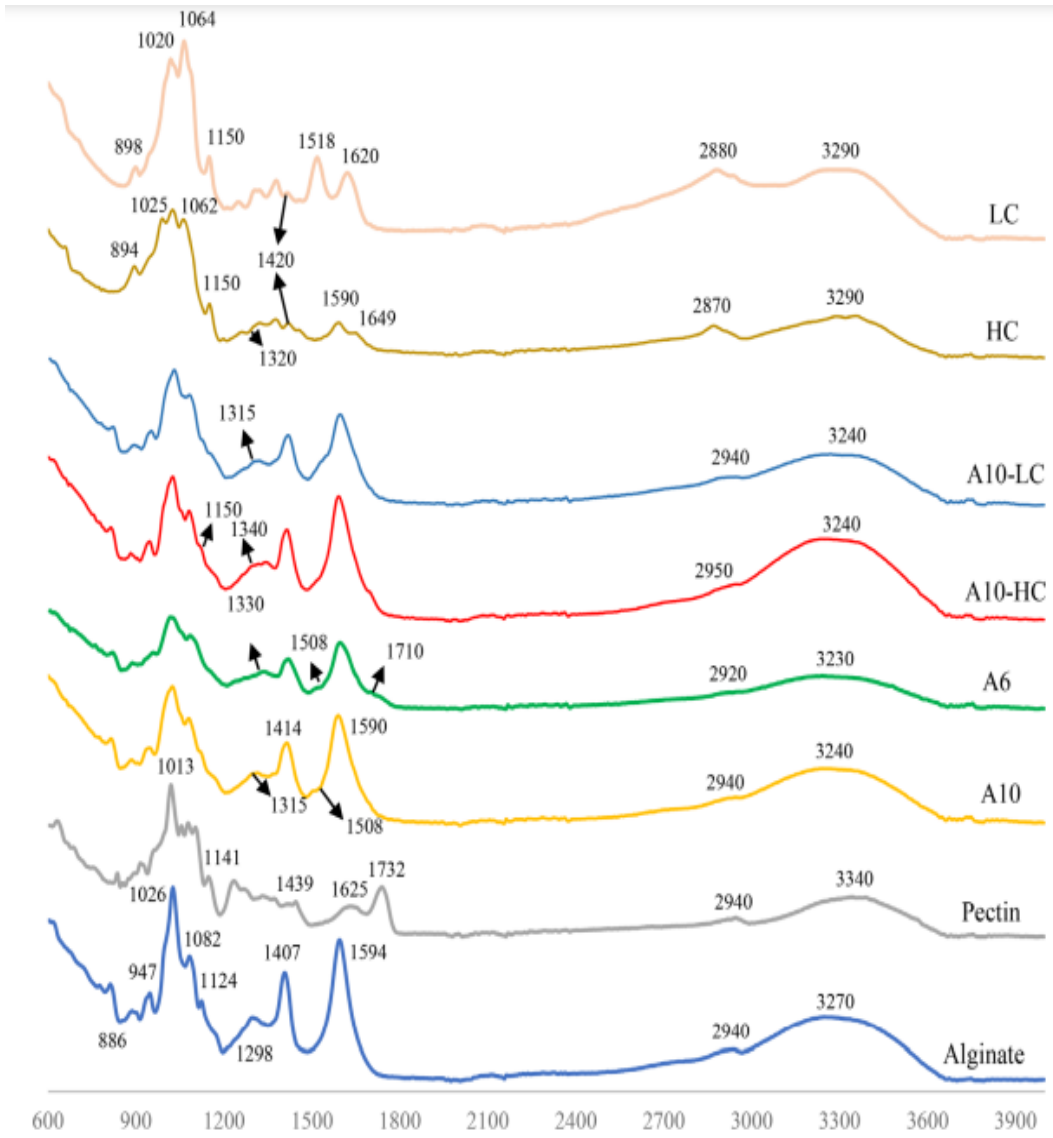
Hidrojellerin LC ya da HC ile kaplanması, tüm formülasyonlarda % EE'yi önemli ölçüde arttırmıştır ve en yüksek %EE (%86.50±-%0.80) değeri A10-LC formülasyonunda gözlenmiştir. Aljinat ve pektinin anyonik karboksilat grupları ile kitosan'ın katyonik amin grupları arasındaki etkileşim, hidrojellerin yapısını değiştirmiş ve yüzeyde büyük gözenekleri kapatan ve sonuç olarak EA'yı matris içinde tutan bir zar üretmiştir [119]. Daha yüksek molekül ağırlık, kitosan'ın jel çekirdeğine difüzyonunu geciktirebilir ve düşük molekül ağırlıklı kitosana (LC) kıyasla EA'nın yapı içinde tutulmasına daha az katkı sağlayabilir. Pektin eklenmiş formülasyonların (A8 ve A6) kitosan kaplamasında da benzer bir eğilim gözlemlenmiştir, ancak % EE değerleri arasında kitosanın molekül ağırlığına bağlı fark önemli bulunmamıştır.

4.5 Forier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Polisakkaritlerin (aljinat, pektin ve kitosan) FTIR spektrumlarında 3230–3290 cm^{-1} 'e ait bölgede absorpsiyon vermeleri, bir polisakkarite bağlı olan OH grubu ile ilişkilidir (Şekil 4.6). Kitosana ait spektrumda, 3290 cm^{-1} bölgesindeki bant, kitosanın N-H ve –OH gruplarının germe titreşiminden kaynaklanıp, aljinat ve pektindeki hidroksil gruplarına ait bant ile üst üste gelmektedir [119]. Spektrumda 2940, 2870 ve 2880 cm^{-1} 'deki pikler, C-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Pektin ve aljinatta 2940 cm^{-1} 'de gözlenen (C-H ve CH₃ titreşimi) piklerin yoğunluğu, hidrojellerde Ca²⁺ iyonlarının varlığında azalmaktadır.[18] Pektine ait IR spektrumunda, 1732 (COOH'nin C = O titreşimi) ve 1625 cm^{-1} (COO–'nin simetrik titreşimi) bölgesinde güçlü karakteristik bantlar gözlenmiştir [121]. Pektinin 1732 cm^{-1} 'de gösterdiği pikin, pektin-aljinat hidrojelinde (A6) daha düşük bölgeye kaydığı (1710 cm^{-1}) ve pik yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Bunun sebebi Ca²⁺ iyonları ile gerçekleşen çapraz bağlanma sonrası moleküllerin hareketinin kısıtlanması olabilir. Aljinatta 1594 ve 1407 cm^{-1} 'de gözlenen bantların, karboksilik grupların asimetrik ve simetrik gerilme pikleri dolayısıyla olduğu söylenebilir. Simetrik gerilme pikinin (1407 cm^{-1}), Ca²⁺ iyonlarının çapraz bağlanmasıyla daha yüksek dalga boyunda daha düşük yoğunlukta sonuç verdiği bildirilmiştir [121]. Bizim örneklerimizde, hidrojellerde, aljinatın Ca²⁺ ile çapraz bağlanması, bu piklerin 1590 ve 1414 cm^{-1} 'e kaymasına neden olmuştur [122]. A10 ve A6 karşılaştırıldığı zaman

aljinat-pektin karışımı ile üretilen hidrojelde bu piklerin yoğunluklarının daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). 1236 cm^{-1} 'de gözlenen pektine ait C-O gerilme piki, hidrojelde Ca^{2+} iyonlarının varlığında titreşimin kısıtlanması nedeniyle kaybolmuştur [121]. Aljinatta 1124 ve 1082 cm^{-1} 'de gözlenen pikler guluronik bloklarla ilişkilendirilmiş ve hidrojelde bu piklerin yoğunluğu Ca^{2+} 'nın bu bloklar içinde bağlanması dolayısıyla azalmıştır (Şekil 4.6). C-O gruplarının karakteristiği olan ve pektinde 1141 cm^{-1} 'de gözlenen pik, A6, aljinat-pektin, hidrojellerinde kaybolmuştur. Örneklerimizde polimerlerde 1026 cm^{-1} 'de gözlenen pik yoğunluğu, hidrojelde kalsiyumun sebep olduğu düzensizlik ve bağlardaki zayıflamadan dolayı azalmaktadır [121]. Çalışmada kullanılan kitosanlar, amidin (amid I bandı) karbonil gerilmesine ve NH'nin bükülme titreşimlerine atfedilen absorpsiyon piklerini 1620 ve 1518 cm^{-1} (LC) ve 1648 ve 1590 cm^{-1} (HC)'de (amid II) ve amid III titreşimlerine karşılık gelen 1456 cm^{-1} 'de göstermiştir [123,124]. 1590 cm^{-1} 'de gözlemlenen kitosana ait karakteristik pikler kaplanmış hidrojelde aynı bölgede gelen aljinata ait piklerle örtüşmektedir. 1150 cm^{-1} 'de gözlenen kitosanın amino gruplarının ($-\text{NH}_2$) piki, kitosana kaplanmış hidrojelde ait piklerde, kalsiyum ve kitosan yapısında bulunan kalsiyum ve oksijen atomları arasındaki kısmi kovalent bağlanmalar dolayısıyla kendisini daha düşük yoğunlukta bir omuz piki olarak göstermiştir (Şekil 4.6) [125].

Bir polifenol madde olarak, EA, 3560 cm^{-1} 'de küçük bir keskin pik 3480 cm^{-1} 'de büyük bir keskin pik 3150 cm^{-1} 'de daha geniş bir pik ile varlığı kanıtlanan birbirleri ile etkileşimli dört hidroksil grubuna sahiptir [126]. EA ile yüklenmemiş aljinat küreciklerinde 3260 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik noktası, EA yüklü örneklerde 3240 cm^{-1} 'e kaymıştır, bu da hidrojelde EA'nın hidroksil grubu ile gerçekleşmiş muhtemel bir hidrojen bağı gösterebilir. EA'ya ait spektrumda 1720 cm^{-1} 'de C=C aromatik gerilme gözlenmiştir, ayrıca 1617 , 1581 ve 1510 cm^{-1} 'de gözlenen pikler C=C-C titreşimlerine, 1450 ve 1375 cm^{-1} 'deki pikler ise C-H eğilme titreşimine atfedilmektedir. EA yüklü hidrojelde, boş hidrojelde rastlanmayan 1508 cm^{-1} 'de bir pik gözlenmiştir. EA spektrumunda 1320 ve 1200 cm^{-1} 'ye ait bölgede gözlemlenen pikler C-O ester bağının gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Aljinat polimeri ve EA yüklenmemiş hidrojellerle karşılaştırıldığında, kitosana kaplanmamış aljinat ve LC ile kaplanan hidrojelde 1315 cm^{-1} 'de bir pik açığa çıkmaktadır ve HC-kaplı aljinat hidrojellerinde 1340 cm^{-1} bölgesine kaymıştır.



Şekil 4.6 Ellajik asit (EA), aljinat, pektin, düşük ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan (LC ve HC), A10, A6 hidrojellerine, LC ve HC kaplı A10 hidrojellerine ait FTIR spektrumları A10-boş hariç diğer tüm hidrojeller EA ile yüklenmiştir.

4.6 Mikrohidrojellerin Jel Kuvveti

Mikrohidrojellerin tekstürel özellikleri, besleme solüsyonundaki polisakkarit bileşiminden, kitosan kaplamasından ve kitosanın molekül ağırlığından etkilenmiştir (Tablo 4.2). En yüksek jel kuvveti kaplanmamış ve sadece aljinat ile üretilen küreciklerde gözlenmiştir ve kuvvet pektin ilavesiyle azalmıştır. Bu durum kalsiyum, pektin ve aljinatın spesifik etkileşiminin sonucu olabilir. Aljinat hidrojellerinin sertliği, çapraz bağlanma derecesine bağlıdır ve aljinat, pektine kıyasla daha doğrusal ve düzenli zincir yapısına sahip olduğu için, kalsiyum iyonları için daha uygun bağlantı noktaları sağlayabilir, bunun sonucunda oluşan hidrojeller daha yüksek sertlik sağlayabilirler. Kalsiyumun belirli bir düzeyin ($>5 \text{ mmol L}^{-1}$) üzerinde bulunmasının aljinat ve yüksek metoksi pektin arasında oluşan jelleri zayıflatacağı da ayrıca daha önce bildirilmiştir [127]. Bir başka çalışmada, pektin ilavesiyle aljinat jellerlerinin ve filmlerin daha zayıf mekanik stabilite gösterdiği bildirilmiştir [128,110,15].

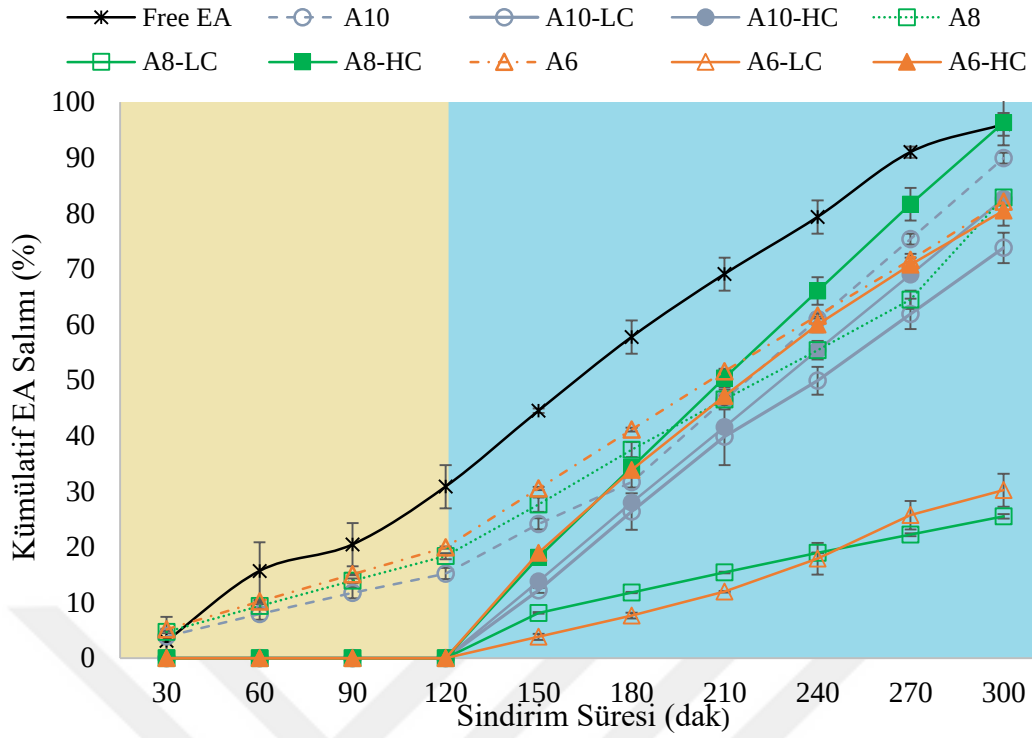
LC ile kaplama, A10 formülasyonunun jel kuvvetini 26.40'tan 11.22 g'ye düşürürken, pektin ilaveli mikrohidrojellerde LC ile kaplama jel gücünü önemli ölçüde değiştirmemiştir. HC ile kaplama, saf aljinat hidrojelinin (A10) jel kuvvetini biraz azaltırken, A6 pektin-aljinat hidrojelinin gücünü artırmıştır. Sonuçlarımıza benzer şekilde, kitosan ile kaplandığında aljinat hidrojelleri için daha düşük bir jel mukavemeti daha önceki çalışmalarda da gözlenmiştir. Bu durum, kitosanın polimer zincirlerinin moleküller arası boşluklarını işgal ederek [15] ve aralarındaki bağları zayıflatması [129] sonucu gösterdiği plastikleştirici etki ile ilgili olabilir.

Kaplanmış numuneler arasında HC kaplama, LC'ye kıyasla her zaman daha yüksek jel mukavemeti sağlamıştır.

LC, düşük molekül ağırlığı ve daha fazla suda çözünürlüğü nedeniyle, Ca-aljinat matrisini daha fazla bozabilir ve bu nedenle jel gücünde daha büyük bir azalmaya neden olabilir. Bir başka çalışmada, benzer şekilde, daha düşük molekül ağırlıklı kitosan ile kaplanan kapsüller, kısa süreli strese maruz kaldıklarında daha yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile kaplananlara kıyasla daha az koruma sağlamıştır [130].

4.7 Simüle Edilmiş Gastrointestinal Sindirim Koşulları Altında Mikrohidrojellerden EA'nın İn Vitro Salınımı

Çalışmamızda, serbest EA ve EA yüklü mikrohidrojeller, art arda simüle edilmiş ağız (0–2 dak), gastrik (2-120 dak) ve bağırsak (120-300 dak) aşamaları içeren bir in vitro sindirim protokolüne tabi tutulmuştur. Muhtemelen kısa süreli olması nedeniyle numunelerin hiçbirinden ağız aşamasında EA salınmamıştır; bu nedenle, bu aşama grafikten çıkarılmıştır. EA'nın SGF ve SIF içinde salınması zamana karşı çizilmiş ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Gastrik sindirimin sonunda, kapsüllenmemiş EA'nın çözünmesi başlangıçtaki miktarın %30.82'sine ulaşırken, A10, A8 ve A6 formüllü hidrojellerde kapsüllenmiş EA için bu değer sırasıyla %15.20, %18.33 ve %19.88 şeklinde olmuştur. Mide koşulları altında, düşük pH'da, kalsiyum-aljinat taneciklerinin, serbest karboksilat gruplarının protonasyonundan kaynaklanan elektrostatik itici kuvvetlerde azalma dolayısıyla büzülme-daralma ve daha zayıf hidrojen bağı ile stabilize olmaları nedeniyle de çözünmeyen bir asit jeli oluşabilir. Karboksil grupları arasında oluşan hidrojen bağları, su moleküllerinin mikroküreciklere nüfuz etmesini engellemiş olabilir [131]. Jel kuvvetinin büzülme-daralmada önemli olduğu ve bu durumun özellikle zayıf jel hidrojeller için daha önemli olduğu bildirilmiştir [132]. SGF koşulları altında, kitosanla kaplanmamış hidrojeller arasında en yüksek EA salımı, aynı zamanda en düşük jel kuvvetini ve en düşük %EE'yi gösteren A6'da; en düşük salım ise, en yüksek jel kuvvetine ve en yüksek %EE'ye sahip olan A10'da gözlenmiştir. Kaplanmamış hidrojellerin simüle edilmiş sindirim koşulları altında, mevcut olan fosfat ve sodyum varlığında parçalanmaya eğilimli olduğu bilinmektedir, çünkü hidrojel yapısında bulunan kalsiyumun fosfat ve sodyum ile yer değiştirmeye eğilimi vardır [130,133]. Aynı zamanda mikrohidrojellerin yüzeyinde tutulabilen EA, SGF ortamına salınmış olabilir. Numunelerimizde, SGF koşulları altında kitosanla kaplanmış hidrojellerden EA salımı gözlemlenmemiştir. Önceki çalışmalar da, gastrik koşullar altında hidrojel matrisinde aktif bileşiklerin korunduğunu ortaya koymuştur [123,134]. Kitosanın düşük pH'da çözünmesi beklenmesine rağmen, aljinat ile oluşturduğu fiziksel ağ, benzer bir çözünme özelliğine sahip olmayabilir [135].



Şekil 4.7 Simüle edilmiş in vitro sindirim koşulları sırasında EA'nın (%) kümülatif salım grafiği. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) olarak sunulmuştur. SGF ve SIF, sırasıyla, simüle edilmiş mide sıvısını ve simüle edilmiş bağırsak sıvısını ifade eder.

Simüle edilmiş sindirim protokolünde, simüle edilmiş ince bağırsak fazının süresi, ilave 120 dak. şeklindedir. Ancak gastrik fazın ardından, kapsüllenmemiş serbest haldeki EA'nın çözünmesinin tamamlanıp tamamlanmayacağını belirlemek için bu süre kasıtlı olarak 180 dak.'ya uzatılmıştır. Diğer matrislerden EA salımı da benzer şekilde hesaplanmıştır. EA'nın çözünmesi, sindirim süresine, çalkalamaya, safra tuzu ve pH'a bağlı olabilir. Örneğin, EA farklı pH değerlerinde (1-7.5), 100 rpm ve 37 °C'de çözündürüldüğü zaman, çözünmenin pH 7.4 tamponunda dengeye ulaştığı ve çözünen miktarın sudakinden 3.5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir [136]. SIF ortamında bulunan safra tuzlarının oluşturduğu miseller de, kapsüllenmemiş serbest haldeki EA'nın çözünürlüğünü arttırmış olabilir. 240 dak sonra, bağırsak aşamasının sonunda serbest EA'nın başlangıçta yüklenen miktara göre yaklaşık %80'i çözölmüştür ve bir saat daha (300. dak'da) SIF ortamında inkübasyondan sonra başlangıçta eklenen miktarın %96'sı çözölmüştür.

Kaplamasız mikrohijrojellerde, 300 dak sonra EA salımı A10 örneğinde %89 ve A6 ve A8 için %82'ye ulaşmıştır, bu da yapıdaki pektinin varlığının SIF ortamı altında EA salımını çok az miktarda azalttığını göstermektedir. SGF'ye göre mikrohijrojellerden

daha yüksek oranda EA salımı, SIF koşullarıyla ilgilidir. Aljinattaki karboksil gruplarının, pH 7.0'de çok güçlü itme kuvvetlerine sahip karboksilat anyonlarına dönüştüğü ve polimer zincirlerinin büyük ölçüde genişleyerek bol miktarda su alımına yol açabileceği bildirilmiştir. Bu durumda, mikrohijroellerde bağı olan Ca^{2+} iyonları bağlantı noktalarından dışarı sızabilir [131] ve yine Ca^{2+} iyonları SIF ortamında bulunan diğer iyonlarla şelatlanabilir veya yer değiştirebilir. Sonuç olarak daha düşük çapraz bağ yoğunluğuna sahip olan jel yapılar oluşabilir ve oluşmuş olan fiziksel polimer ağına daha fazla aşınması gerçekleşebilir. Örneğin Ca^{2+} , karboksilik asit grupları arasında köprü kurabilme özelliğine sahip olmayan Na^+ iyonlarıyla yer değiştirebilir [119] ve yine nötr pH değerlerinde kalsiyum iyonları aljinat yerine fosfat iyonlarıyla şelatlanabilir [11].

HC ile kaplanmış örneklerde, kaplanmamış hidrojelere kıyasla farklı bir EA salımı gözlenmezken, LC kaplamada, SIF ortamında meydana gelen EA salımı önemli miktarda azaltmıştır. Örneğin, bağırsak aşamasının sonunda (240 dak), LC kaplı A6 ve A8 mikrohijroellerinden EA salımı sadece %18 civarında iken; kaplanmamış veya HC ile kaplanmış A6 ve A8 örnekleri için bu oran %55-65 aralığında olmuştur. Kitosan tabakası, hidrojel matrisinin parçalanmasına karşı bir miktar direnç sağlayabilir ve bu durum kapsüllenmiş olan bileşiğin uzatılmış salımına yardımcı olabilir. Bununla birlikte, SIF koşulları altında, kitosan pozitif yükünün çoğunu kaybedebilir, dolayısıyla polielektrolit ağ tahrip olmuş olabilir ve daha güçlü bağlanma kuvvetlerine sahip matrislerde bu süreç daha uzun sürebilir. Kitosanın düşük moleköl ağırlığı, daha fazla sayıda $-NH_3^+$ grubuna sahip olmasını, daha yüksek çapraz bağlanma yapabilmesini ve mikrohijroel içine daha derin difüz edebilmesini sağlayabilmekte, gözenekleri daha fazla tıkayabilmekte bu şekilde, SIF'nin mikroküreciğin iç kısmına penetrasyonunu kısıtlayabilmekte, matrisin parçalanmasını geciktirebilmekte ve kapsüllenmiş bileşiğin salımını yavaşlatabilmektedir [119].

Bağırsak aşamasının sonunda, LC kaplı sadece aljinat ile üretilen A10 mikrohijroellerinden EA salımı (%49.87), kaplanmamış A10'dan (%61) ve HC kaplı A10 mikrohijroellerden (%55.35) hala daha düşük olmasına rağmen, yapısında pektin içeren diğer LC-kaplı mikrohijroellerden daha yüksek olmuştur. Yapısında pektin içeren LC kaplı numunelerde, aljinatın pektin ile etkileşimi matrisin parçalanmasını yavaşlatmış olabilir.

Bu çalışmada, ellajik asit hidrojel mikropartiküllere başarıyla yüklenmiş ve mikropartiküllerin boyutu ve morfolojisi besleme solüsyonunda kullanılan biyopolimer bileşimine ve mikropartiküllerin farklı moleküler ağırlıklarda kitosan ile kaplanıp kaplanmadığına bağlı olarak değişmiştir. Formülasyona pektin eklenmesi, kapsülleme etkinliğini ve jel kuvvetini azaltmış, kitosan ile kaplama ise, aktif bileşiğin tutulmasını arttırmış ve saf aljinat tanelerinin jel kuvvetini azaltmıştır. FTIR spektrumları, aljinat-kitosan'ın iyonik etkileşimini ve ellajik asitin jel ağı içinde tutulmasını doğrulamıştır. Mikropartiküllerin LC kaplanması, kaplanmamış ve HC kaplı mikropartiküllere kıyasla simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında ellajik asit için uzatılmış bir salım profili göstermiştir. Çalışmamızda önerilen kapsülleme sisteminde ellajik asidin mide ve ince bağırsak koşulları sırasında korunması, doğrudan emilimini sınırlar, sistemik dolaşımdan hızlı bir şekilde elimine edilmesini sağlar ve ayrıca insan bağırsak mikrobiyotası tarafından biyoyararlılığı daha yüksek olan ürolitinlere dönüştürülmek üzere kalın bağırsağa daha fazla ellajik asit taşınmasına olanak sunar. Bu nedenle, LC ile kaplanmış aljinat-pektin tanecikleri, kaplanmış saf aljinat taneciklerine kıyasla daha uzun salım sunmuştur, bu durumda ellajik asidin kolon hedefli iletimi için bir potansiyele sahip olabilir. Ancak daha ileri hayvan çalışmaları yapılarak araştırılmalıdır.

- [1] Ceci, C., Graziani, G., Faraoni, I., & Cacciotti, I., "Strategies To Improve Ellagic Acid Bioavailability: From Natural Or Semisynthetic Derivatives To Nanotechnological Approaches Based On Innovative Carriers" *Nanotechnology*, 31(38), 2020.
- [2] Alhakamy, N. A., Badr-Eldin, S. M., Ahmed, O. A., Halwani, A. A., Aldawsari, H. M., A El-Moselhy, M., ... & Bakhrebah, M. A., "Optimized Ellagic Acid–Ca Pectinate Floating Beads for Gastroprotection against Indomethacin-Induced Gastric Injury in Rats" *Biomolecules* 10(7), 1006, 2020.
- [3] Luján-Medina G A, Ventura J, Ascacio-Valdés J A, Cerqueira M A, Villa D B, Contreras-Esquivel J C, Aguilar González M A, Antóniovicente and Aguilar C. N., "Microencapsulation of ellagic acid from pomegranate husk and karaya gum by spray drying" *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7, 212-216, 2015.
- [4] Lee, K. Y., & Mooney, D. J., "Alginate: properties and biomedical applications" *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126, 2012.
- [5] Nikoo, A. M., Kadakhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H., & Tucker, N., "Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels" *International journal of biological macromolecules*, 116, 208-216, 2018.
- [6] Khorram, M., Samimi, M., Samimi, A., & Moghadam, H., "Electrospray preparation of propranolol-loaded alginate beads: Effect of matrix reinforcement on loading and release profile" *Journal of Applied Polymer Science*, 132(4), 2015.
- [7] A. Rafiee, M.H. Alimohammadian, T. Gazori, F. Riazi-rad, S.M.R. Fatemi, A. Parizadeh, I. Haririan, M. Havaskary, "Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection" *Asian Pacific J. Trop. Dis.*, 4, 372–377, 2014.
- [8] M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, K. Goracinova, "Chitosan coated Caalginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa" *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 68, 565–578, 2008.
- [9] O. Masalova, V. Kulikouskaya, T. Shutava, V. Agabekov, "Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment" *Phys. Procedia*, 40, 69–75, 2013.
- [10] Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I., Vojvodić, A., Mršić, G., Komes, D., "Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin" *Food Hydrocolloids*, 57, 139–152, 2016.
- [11] A.K. Anal, W.F. Stevens, "Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin" *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1-2), 45–54, 2005.
- [12] Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., & Ribeiro, A., "Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies" *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 1–7, 2006.
- [13] Khazaeli, P., Pardakhti, A., Hasanzadeh F., "Formulation of ibuprofen beads by ionotropic gelation" *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 163-170, 2008.
- [14] Aguilar, K. C., Tello, F., Bierhalz, A. C. K., Garnica Romo, M. G., Martínez Flores, H. E., & Grosso, C. R. F., "Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation" *Journal of Food Engineering*, 154, 17–24, 2015.
- [15] Da Silva Carvalho, A. G., da Costa Machado, M. T., de Freitas Queiroz Barros, H. D., Cazarin, C. B. B., Junior, M. R. M., & Hubinger, M. D., "Anthocyanins from

- jussara (*Euterpe edulis Martius*) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation” *Powder Technology*, 345, 283-291, 2019.
- [16] Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., Dehghan, S., Khaksar, R., “Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process” *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 582–588, 2013.
 - [17] Steipel, R. T., Gallovic, M. D., Batty, C. J., Bachelder, E. M., Ainslie, K. M., “Electrospray for generation of drug delivery and vaccine particles applied in vitro and in vivo”, *Materials Science and Engineering: C*, 110070, 2019.
 - [18] Wu, Y., Duong, A., Lee, L.I., Wyslouzil, B.E., “Electrospray Production of Nanoparticles for Drug/Nucleic Acid Delivery”, *Intech Europe, Rijeka*, 2012.
 - [19] Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., d’Amore, M., Aquino, R. P., & Lauro, M. R., “Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts” *Journal of Food Engineering*, 105(3), 468-476, 2011.
 - [20] Nikoo, A. M., Kadakhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H., & Tucker, N., “Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels” *International journal of biological macromolecules*, 116, 208-216, 2018.
 - [21] Fukui, Y., Maruyama, T., Iwamatsu, Y., Fujii, A., Tanaka, T., Ohmukai, Y., & Matsuyama, H., “Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370(1-3), 28–34, 2010.
 - [22] Mady, F., & Shaker, M., “Enhanced anticancer activity and oral bioavailability of ellagic acid through encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles” *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 7405–7417, 2017.
 - [23] Arulmozhi, V., Pandian, K., & Mirunalini, S., “Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB)” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 313–320, 2013.
 - [24] Ratnam, D. V., Chandraiah, G., Meena, A. K., Ramarao, P., & Ravi Kumar, M. N. V., “The Co-Encapsulated Antioxidant Nanoparticles of Ellagic Acid and Coenzyme Q10 Ameliorates Hyperlipidemia in High Fat Diet Fed Rats” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(11), 6741–6746, 2009.
 - [25] Koo, S. Y. , Cha, K. H. , Song, D. G., Chung, D. , & Pan, C.H., “Microencapsulation of peppermint oil in an alginate-pectin matrix using a coaxial electrospray system” *International Journal of Food Science & Technology*, 49(3), 733–739, 2013.
 - [26] Alkhatib, H., Mohamed, F., Akkawi, M. E., Alfatama, M., Chatterjee, B., & Doolaanea, A. A., “Microencapsulation of black seed oil in alginate beads for stability and taste masking” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 102030, 2020.
 - [27] Yao, Z.-C., Jin, L.-J., Ahmad, Z., Huang, J., Chang, M.-W., & Li, J.-S., “*Ganoderma lucidum* polysaccharide loaded sodium alginate micro-particles prepared via electrospraying in controlled deposition environments” *International Journal of Pharmaceutics*, 524(1-2), 148–158, 2017.
 - [28] Almurisi, S. H., Doolaanea, A. A., Akkawi, M. E., Chatterjee, B., & Islam Sarker, M. Z., “Taste masking of paracetamol encapsulated in chitosan-coated alginate beads” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101520, 2020.
 - [29] Zhao, S., Agarwal, P., Rao, W., Huang, H., Zhang, R., Liu, Z., Yu, J. , Weisleder, N. , Zhang, W. , He, X., “Coaxial electrospray of liquid core–hydrogel shell microcapsules for encapsulation and miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells” *Integr. Biol.*, 6(9), 874–884, 2014.

- [30] Park, H. , Kim, P.-H. , Hwang, T. , Kwon, O.-J. , Park, T.-J. , Choi, S.-W. , Yun, C.-O. Kim, J. H., “Fabrication of cross-linked alginate beads using electrospraying for adenovirus delivery” *International Journal of Pharmaceutics*, 427(2), 417–425, 2012.
- [31] Ríos, J.-L., Giner, R., Marín, M., & Recio, M., “A Pharmacological Update of Ellagic Acid” *Planta Medica*, 84(15), 1068-1093, 2018.
- [32] Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A., “Ellagitannins, ellagic acid and vascular health” *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513–539, 2010.
- [33] Vattem, D. A., & Shetty, K., “Biological Functionality Of Ellagic Acid: A Review” *Journal Of Food Biochemistry*, 29(3), 234–266, 2005.
- [34] Maas, J. L., Galletta, G. J., & Stoner, G. D., “Ellagic Acid, an Anticarcinogen in Fruits, Especially in Strawberries: A Review” *HortScience HortSci*, 26(1), 10-14, 1991.
- [35] Yoganathan, S., Alagaratnam, A., Acharekar, N., & Kong, J., “Ellagic Acid and Schisandrins: Natural Biaryl Polyphenols with Therapeutic Potential to Overcome Multidrug Resistance in Cancer” *Cells*, 10(2), 458, 2021.
- [36] Nyamba, I., Lechanteur, A., Semdé, R., & Evrard, B., “Physical formulation approaches for improving aqueous solubility and bioavailability of ellagic acid: A review” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 159, 198–210, 2021.
- [37] Landete, J. M., “Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health” *Food Research International*, 44(5), 1150–1160, 2011.
- [38] Junyaprasert, V. B., Singhsa, P., Suksiriworapong, J., & Chantasart, D., “Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid” *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 303–311, 2012.
- [39] Madrigal-Carballo, S., Lim, S., Rodriguez, G., Vila, A. O., Krueger, C. G., Gunasekaran, S., & Reed, J. D., “Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid” *Journal of Functional Foods*, 2(2), 99–106, 2010.
- [40] Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N., “Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189–199, 2007.
- [41] Nuncio-Jáuregui, N., Nowicka, P., Munera-Picazo, S., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Wojdyło, A., “Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning and ripe Spanish pomegranates” *Journal of Functional Foods*, 12, 354–364, 2015.
- [42] Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T., “Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds” *Molecules*, 18(2), 2328–2375, 2013.
- [43] De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E., “Phenolic Compounds” *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 253–271, 2019.
- [44] Mady FM, Ibrahim SR., “Cyclodextrin-based nanosponge for improvement of solubility and oral bioavailability of Ellagic acid” *Pak J Pharm Sci.*, 31(5), 2069-2076, 2018.
- [45] Cannataro, R., Fazio, A., La Torre, C., Caroleo, M. C., & Cione, E., “Polyphenols in the Mediterranean Diet: From Dietary Sources to microRNA Modulation” *Antioxidants*, 10(2), 328, 2021.

- [46] Seeram, N. P., Lee, R., & Heber, D., "Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice" *Clinica Chimica Acta*, 348(1-2), 63–68, 2004.
- [47] Muthukumaran, S., Tranchant, C., Shi, J., Ye, X., & Xue, S. J., "Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects" *Food Quality and Safety*, 1(4), 227–252, 2017.
- [48] Alfei, S., Marengo, B., & Zuccari, G., "Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins?" *Antioxidants*, 9(8), 707, 2020.
- [49] Shahidi, F., & Han, X., "Encapsulation of food ingredients" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501–547, 1993.
- [50] Fang, Z., & Bhandari, B., "Encapsulation of polyphenols – a review" *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523, 2010.
- [51] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B., "An overview of encapsulation technologies for food applications" *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815, 2011.
- [52] F. Gibbs, Selim Kermasha, Inteaz Al, B., "Encapsulation in the food industry: a review" *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224, 1999.
- [53] Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y., "Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency" *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187–197, 2010.
- [54] Castro Coelho, S., Nogueiro Estevinho, B., & Rocha, F., "Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and Electrospraying - A review" *Food Chemistry*, 127850, 2020.
- [55] Niu, B., Shao, P., Luo, Y., & Sun, P., "Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application" *Food Hydrocolloids*, 105376, 2019.
- [56] Abd El-Kader, A., Abu Hashish, H., "Encapsulation Techniques of Food Bioproduct" *Egyptian Journal of Chemistry*, 63(5), 1881-1909, 2020.
- [57] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... Nejati-Koshki, K., "Liposome: classification, preparation, and applications" *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102, 2013.
- [58] Da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., & Brandelli, A., "Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides" *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), 284–292, 2010.
- [59] Risch, S. J., "Encapsulation: Overview of Uses and Techniques" *ACS Symposium Series*, 2–7, 1995.
- [60] Kırtıl, E., Öztop, M., H., "Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi" *Akademik Gıda*, 12(4), 41-57, 2014.
- [61] "Encapsulation Processes" In: *Food Powders, Food Engineering Series*. Springer, Boston, MA., 199-219, 2005.
- [62] Song, L. X., Bai, L., Xu, X. M., He, J., & Pan, S. Z., "Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry" *Coordination Chemistry Reviews*, 253(9-10), 1276–1284, 2009.
- [63] Ho, S., Thoo, Y. Y., Young, D. J., & Siow, L. F., "Inclusion complexation of catechin by β -cyclodextrins: Characterization and storage stability" *LWT*, 86, 555–565, 2017.
- [64] Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J., "Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in

- microencapsulation” *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276-1286, 2018.
- [65] Yan, C., & Zhang, W., “Coacervation Processes” *Microencapsulation in the Food Industry*, 125–137, 2014.
- [66] Martins IM, Rodrigues SN, Barreiro F, Rodrigues AE. “Microencapsulation of thyme oil by coacervation” *J Microencapsul*, 26(8), 667-75, 2009.
- [67] Freitas, S., Merkle, H. P., & Gander, B., “Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology” *Journal of Controlled Release*, 102(2), 313–332, 2005.
- [68] Li M, Rouaud O, Poncelet D., “Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches” *Int J Pharm.*, 363(1-2), 26-39, 2008.
- [69] Chu, B.-S., Ichikawa, S., Kanafusa, S., & Nakajima, M., “Preparation of Protein-Stabilized β -Carotene Nanodispersions by Emulsification–Evaporation Method” *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 84(11), 1053–1062, 2007.
- [70] C. Anandharamakrishnan, S. Padma Ishwarya, “Spray drying for encapsulation” *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*, John Wiley & Sons, 65–76, 2015.
- [71] Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J.-C., & Eun, J.-B., “Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato” *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1307–1312, 2010.
- [72] Souza, A. L. R., Hidalgo-Chávez, D. W., Pontes, S. M., Gomes, F. S., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V., “Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability” *LWT*, 91, 286–292, 2018.
- [73] Munin, A., & Edwards-Lévy, F., “Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review” *Pharmaceutics*, 3(4), 793–829, 2011.
- [74] Oxley, J. D., “Spray cooling and spray chilling for food ingredient and nutraceutical encapsulation” *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, 110–130, 2012.
- [75] Varhan, E., Koç M., “Gıda Bileşenlerinin Sprey Soğutma Yöntemi ile Enkapsülasyonu” *Food and Health*, 4(3), 202-212, 2018.
- [76] Bamidele, O. P., & Emmambux, M. N., “Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: a review” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19, 2020.
- [77] Nikolaou, M., & Krasia-Christoforou, T., “Electrohydrodynamic methods for the development of pulmonary drug delivery systems” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113, 29–40, 2018.
- [78] Chakraborty, S., Liao, I.-C., Adler, A., & Leong, K. W., “Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), 1043–1054, 2009.
- [79] Jacobsen, C., García-Moreno, P. J., Mendes, A. C., Mateiu, R. V., & Chronakis, I. S., “Use of Electrohydrodynamic Processing for Encapsulation of Sensitive Bioactive Compounds and Applications in Food” *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 525–549, 2018.
- [80] Wen, P., Zong, M.-H., Linhardt, R. J., Feng, K., & Wu, H., “Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds” *Trends in Food Science & Technology*, 70, 56–68, 2017.
- [81] Moreira, A., Lawson, D., Onyekuru, L., Dziemidowicz, K., Angkawinitwong, U., Costa, P. F., ... Williams, G. R., “Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying” *Journal of Controlled Release*, 329, 1172–1197, 2021.

- [82] Neo, Y. P., Ray, S., Jin, J., Gizdavic-Nikolaidis, M., Nieuwoudt, M. K., Liu, D., & Quek, S. Y., "Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system" *Food Chemistry*, 136(2), 1013–1021, 2013.
- [83] Zare, M., Dziemidowicz, K., Williams, G. R., & Ramakrishna, S., "Encapsulation of Pharmaceutical and Nutraceutical Active Ingredients Using Electrospinning Processes" *Nanomaterials*, 11(8), 1968, 2021.
- [84] Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A., "Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art" *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1510–1551, 2012.
- [85] Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E., "Materials for Encapsulation" In: Zuidam N., Nedovic V. (eds), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 31–100, Springer, New York, NY, 2009.
- [86] Barbosa-Cánovas, G., V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H., "Physical Properties, Processing, and Functionality" *Food Powders*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.
- [87] Bratovčić, A., & Suljagić, J., "Micro- and nano-encapsulation in food industry" *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 113–121, 2019.
- [88] Tan, W.-H., & Takeuchi, S., "Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation" *Advanced Materials*, 19(18), 2696–2701, 2007.
- [89] Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M., "Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation" *Carbohydrate Polymers*, 170, 1–14, 2017.
- [90] Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W., "Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications" *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1–12, 2012.
- [91] Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., ... Tong, Q., "Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds" *Trends in Food Science & Technology*, 90, 35–46, 2019.
- [92] Mishra R., Banthia A. K., Majeed A., "Pectin based formulations for biomedical applications: A review" *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(4), 1–7, 2012.
- [93] Călinoiu, L.-F., Ștefănescu, B., Pop, I., Muntean, L., & Vodnar, D., "Chitosan Coating Applications in Probiotic Microencapsulation" *Coatings*, 9(3), 194, 2019.
- [94] Raza, Z. A., Khalil, S., Ayub, A., & Banat, I. M., "Recent developments in chitosan encapsulation of various active ingredients for multifunctional applications" *Carbohydrate Research*, 492, 108004, 2020.
- [95] Patil, J.S., Kamalapur, M.V., Marapur, S.C., Kadam, D.V., "Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review" *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 2010.
- [96] Pedroso-Santana, S., & Fleitas-Salazar, N., "Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes" *Polymer International*, 69(5), 443–447, 2020.
- [97] Goudanavar, P., S., Bagali, R., S., Chandrashekhara, S., Patil, S., M., "Design and Characterization of diclofenac sodium microbeads by ionotropic gelation technique" *IJAPBC*, Vol. 4(2), 2010.
- [98] Sacco, P., Pedroso-Santana, S., Kumar, Y., Joly, N., Martin, P., & Bocchetta, P., "Ionotropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications" *Molecules*, 26(3), 660, 2021.

- [99] Desai, K. G., "Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances" *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(2), 107–158, 2016.
- [100] Chalanqui M.J., Pentlavalli S., McCrudden C., Chambers P., Ziminska M., Dunne N. et al., "Influence of alginate backbone on efficacy of thermo-responsive alginate-g-P(NIPAAm) hydrogel as a vehicle for sustained and controlled gene delivery" *Mater Sci Eng, C* 95, 409– 421, 2019.
- [101] Karadag A., Özçelik B., Sramek M., Gibis M., Kohlus R. and Weiss J., "Presence of electrostatically adsorbed polysaccharides improves spray drying of liposomes" *J Food Sci*, 78, E206– E221, 2013.
- [102] Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C. et al., "A standardised static in vitro digestion method suitable for food: an international consensus" *Food Funct*, 5, 1113– 1124, 2014.
- [103] Chen F., Zhang Z., Deng Z., Zhang R., Fan G., Ma D. et al., "Controlled-release of antacids from biopolymer microgels under simulated gastric conditions: impact of bead dimensions, pore size, and alginate/pectin ratio" *Food Res Int*, 106, 745– 751, 2018.
- [104] Ramos P.E., Silva P., Alario M.M., Pastrana L.M., Teixeira J.A., Cerqueira M.A. et al., Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. *Food Hydrocolloids* 77: 8– 16 (2018).
- [105] Davarcı F., Turan D., Ozcelik B. and Poncelet D., "The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique" *Food Hydrocolloids*, 62, 119– 127, 2017.
- [106] Partovinia A. and Vatankhah E., "Experimental investigation into size and sphericity of alginate micro-beads produced by electrospraying technique: operational condition optimization" *Carbohydr Polym*, 209, 389– 399, 2019.
- [107] Sundaram J. and Durance T., "Particle size distribution of alginate–pectin microspheres: effect of composition and methods of production", in 2007 ASAE Annual Meeting, St Joseph, MI. ASABE, 2007.
- [108] Voo W.P., Ravindra P., Tey B.T. and Chan E.S., "Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells" *J Biosci Bioeng*, 111, 294– 299, 2011.
- [109] Wang H., Fei S., Wang Y., Zan L. and Zhu J., "Comparative study on the self-assembly of pectin and alginate molecules regulated by calcium ions investigated by atomic force microscopy" *Carbohydr Polym*, 231, 115673, 2020.
- [110] Bekhit M., Sánchez-González L., Messaoud G.B. and Desobry S., "Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on alginate/pectin composite microbeads: effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release" *J Food Eng*, 180, 1– 9, 2016.
- [111] Gåserød O., Smidsrød O. and Skjåk-Bræk G., "Microcapsules of alginate–chitosan. I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan" *Biomaterials*, 19, 1815– 1825, 1998.
- [112] Qi X., Simsek S., Chen B. and Rao J., "Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: effect of biopolymer type and concentrations" *Int J Biol Macromol*, 165, 1675– 1685, 2020.
- [113] Falsafi S.R., Rostamabadi H., Assadpour E. and Jafari S.M., "Morphology and microstructural analysis of bioactive-loaded micro/nanocarriers via microscopy techniques: CLSM/SEM/TEM/AFM" *Adv Colloid Interface Sci*, 280, 102166, 2020.

- [114] Aston R., Sewell K., Klein T., Lawrie G. and Grøndahl L., “Evaluation of the impact of freezing preparation techniques on the characterisation of alginate hydrogels by cryo-SEM” *Eur Polym J*, 82, 1– 15, 2016.
- [115] Walkenström P., Kidman S., Hermansson A.M., Rasmussen P.B. and Hoegh L., “Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels” *Food Hydrocoll*, 17, 593–603, 2003.
- [116] Kiaei Pour P., Alemzadeh I., Vaziri A.S. and Beiroti A., “Potential effects of alginate–pectin biocomposite on the release of folic acid and their physicochemical characteristics” *J Food Sci Technol*, 57, 3363–3370, 2020.
- [117] Koo S.Y., Cha K.H., Song D.G., Chung D. and Pan C.H., “Microencapsulation of peppermint oil in an alginate–pectin matrix using a coaxial electrospray system” *Int J Food Sci Technol*, 49, 733–739, 2014.
- [118] Madziva H., Kailasapathy K. and Phillips M., “Alginate–pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods” *J Microencapsul*, 22, 343–351, 2005.
- [119] Nikoo A.M., Kadakhodae R., Ghorani B., Razzaq H. and Tucker N., “Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels” *Int J Biol Macromol*, 116, 208–216, 2018.
- [120] Sartori C., Finch D.S., Ralph B. and Gilding K., “Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy” *Polymer (Guildf)*, 38, 43–51, 1997.
- [121] Belscak-Cvitanovic A., Komes D., Karlović S., Djaković S., Špoljarić I., Mršić G. et al., “Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium” *Food Chem*, 167, 378–386, 2015.
- [122] Su R., Zhu X.L., Di Fan D., Mi Y., Yang C.Y. and Jia X., “Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate–human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions” *Int J Biol Macromol*, 49, 979–984, 2011.
- [123] Almurisi S.H., Doolaanea A.A., Akkawi M.E., Chatterjee B. and Sarker M.Z.I., “Taste masking of paracetamol encapsulated in chitosan-coated alginate beads” *J Drug Deliv Sci Technol*, 56, 101520, 2020.
- [124] Ahlawat J., Neupane R., Deemer E., Sreenivasan S.T. and Narayan M., “Chitosan–ellagic acid nanohybrid for mitigating rotenone-induced oxidative stress” *ACS Appl Mater Interfaces*, 12, 18964– 18977, 2020.
- [125] Kusuktham B., Prasertgul J. and Srinun P., “Morphology and property of calcium silicate encapsulated with alginate beads” *Silicon*, 6, 191– 197, 2014.
- [126] Vilela C., Pinto R.J.B., Coelho J., Domingues M.R.M., Daina S., Sadocco P. et al., “Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection for active food packaging” *Food Hydrocoll*, 73, 120– 128, 2017.
- [127] Toft K., Grasdalen H. and Smidsrød O., “Synergistic gelation of alginates and pectins” in *Chemistry and Function of Peptins*, ed. by ML Fishman and JJ Jen. ACS, Washington, DC, pp. 117– 132, 1986.
- [128] Bierhalz A.C.K., Da Silva M.A. and Kieckbusch T.G., “Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications” *J Food Eng*, 110, 18– 25, 2012.
- [129] Vieira M.G.A., Da Silva M.A., Dos Santos L.O. and Beppu M.M., “Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review” *Eur Polym J*, 47, 254– 263, 2011.
- [130] Gåserød O., Sannes A. and Skjåk-Bræk G., “Microcapsules of alginate–chitosan. II. A study of capsule stability and permeability” *Biomaterials*, 20” 773– 783, 1999.

- [131] Song B., “Lotus leaf-inspired design of calcium alginate particles with superhigh drug encapsulation efficiency and pH responsive release” *Colloids Surf B Biointerfaces*, 172, 464– 470, 2018.
- [132] Rayment P., Wright P., Hoad C., Ciampi E., Haydock D., Gowland P. et al., “Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality” Part 1: In vitro characterisation, *Food Hydrocoll*, 23, 816– 822, 2009.
- [133] Lee B.J., Cui J.H., Kim T.W., Heo M.Y. and Kim C.K., “Biphasic release characteristics of dual drug-loaded alginate beads” *Arch Pharm Res*, 21, 645– 650, 1998.
- [134] Patel N., Desai J., Kumar P. and Thakkar H.P., “Development and in vitro characterization of capecitabine-loaded alginate–pectinate–chitosan beads for colon targeting” *J Macromol Sci, Part B Physi* 55, 33– 54, 2016.
- [135] Shi J., Alves N.M. and Mano J.F., “Chitosan coated alginate beads containing poly(N-isopropylacrylamide) for dual-stimuli-responsive drug release” *J Biomed Mater Res – Part B Appl Biomater*, 84, 595– 603, 2008.
- [136] Bala I., Bhardwaj V., Hariharan S. and Kumar M.N.V.R., “Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies” *J Pharm Biomed Anal*, 40, 206– 210, 2006.
- [137] Wang, W., Bo, S., Li, S., & Qin, W. “Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation” *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(5), 281–285, 1991.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. Karakas, C. Y., Ordu, H. R., Bozkurt, F., & Karadag, A. (2021). Electrospayed chitosan-coated alginate–pectin beads as potential system for colon-targeted delivery of ellagic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.11430>

