



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



**ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ NİOZOM TEKNİĞİ İLE
MİKROENKAPSÜLASYONU VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ**

Aygül CAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ
NİOZOM TEKNİĞİ İLE
MİKROENKAPSÜLASYONU
VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Aygöl CAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 16/08/2017

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA

ÇANAKKALE

Aygül CAN tarafından Yrd. Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA yönetiminde hazırlanan ve **16/08/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Zeytin Yaprığı Ekstraktının Niozom Tekniği ile Mikroenkapsülasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA

.....

Başkan

Prof. Dr. Cengiz CANER

.....

Üye

Doç. Dr. Onur GÜNEŞER

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koodinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2016-958

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Aygül CAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, bana yol gösteren ve deneyimlerinden faydalandığım saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA'ya teşekkür ederim.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve Fen Bilimleri Enstitüsü'ne,

Jüri üyesi olarak çalışmamızı değerlendiren değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Cengiz CANER ve Doç. Dr. Onur GÜNEŞER'e,

Çalışmamıza laboratuvar aşamasında katkıda bulunan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, maddi ve manevi desteği bir an olsun esirgemeyen değerli hocalarım Fernanda GALGANO, Marisa Carmela CARUSO ve değerli arkadaşım Roberta TOLVE'ye,

Bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra yardımlarıyla da çalışmalarına her zaman katkıda bulunan Uzman Dr. Aslı KİRAZ, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN, öğrencileri Burcu EFE ve Furkan GALATA'ya,

ÇOMÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, değerli hocam Prof. Dr. Metehan UZUN, Sait ELMAS ve değerli arkadaşım Ufuk DEMİR'e,

Çalışmanın laboratuvar aşamasında çeşitli alet ve ekipmanların kullanmasında imkân sağlayan sayın Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNLER ve öğrencilerine,

Çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan, bilgi paylaşımıyla çalışmalarımı ileriye taşıyan değerli hocam Arş. Gör. Dr. Müge İŞLETEN HOŞOĞLU'na, değerli arkadaşlarım Egemen ÖZÇELİK ve Aysu KAYA ERDEN'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Saygısıyla, sevgisiyle, hayatımın her evresinde bana destek olan annem Muhsine CAN, babam Saim CAN ablam Ayşegül CAN IŞIK ve eşi Emin IŞIK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aygül CAN
Çanakkale, Ağustos 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
CPP	Kritik Ambalaj Parametresi
CUPRAC	Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite
DAD	Diode Array Dedektörü
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrihidrazil
DRM	Dehidrasyon Rehidrasyon Yöntemi
dw	Kuru ağırlık
EMB	Eosin Methylen-blue Lactose Sucrose
FF-TEM	Dondurarak Kırma Replikasyonu-Elektron Mikroskobu
g	Gram
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
HLB	Hidrofilik-Lipofilik Denge
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀	DPPH Radikalinin %50'sini İnhibe Eden Konsantrasyon
km	Kuru Ağırlık
LUV	Büyük Tek Katmanlı Veziküller
µm	Mikrometre
mM	Milimolar
M	Molar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mL	Mililitre
MLV	Çok Katmanlı Veziküller
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus
mV	Milivolt
nm	Nanometre
O/W	Su içinde yağ emülsiyonu
ZYE	Zeytin Yaprağı Ekstraktı
PALCAM	Listeria Identification Agar Base
PALS	Faz Analizi Işık Saçılması
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PLD	Polidispersite İndeksi
QE	Kuersetin Eşdeğeri
REV	Ters Faz Evaporasyonu Yöntemi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SUV	Küçük Tek Katmanlı Veziküller
Tc	Yüzey Aktif Maddenin Jel Sıvı Geçiş Sıcaklığı
TE	Troloks Eşdeğeri
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TFC	Toplam Flavonoid Miktarı
TFH	İnce Film Hidrasyon Yöntemi
TPC	Toplam Fenol Miktarı
US	Ultrases
UV	Ultraviyole
W/O	Yağ İçinde Su Emülsiyonu
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate

ÖZET

ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ NİOZOM TEKNIĞİ İLE MİKROENKAPSÜLASYONU VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Aygül CAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA

16/08/2017, 92

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) yaprakları, başta oleuropein olmak üzere yüksek miktarda fenolik içermesiyle nutrasötik açıdan zengin bir ham maddedir. Zeytin yaprağı ekstraktındaki (ZYE) oleuropein ve diğer fenolikler, gıda sektöründe doğal antimikrobiyal maddeler olarak önemli potansiyele sahiptir. Ancak, ZYE'nin acı tadı kullanımını sınırlamaktadır. Niosomal mikrokapsülasyon tekniği, acı tadı maskelemek ve antimikrobiyal maddenin gıdaya veya bakteri hücrelerine difüzyonunu arttırmak gibi bazı avantajlara sahiptir. Dolayısıyla, bu çalışmanın temel amacı farklı kültür çeşitlerine ait zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ZYE'nin oleuropein içeriği ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi ile birlikte ZYE ve ZYE yüklü niozomların antimikrobiyal ajan olarak kullanımının araştırılmasıdır.

ZYE'nin oleuropein içeriği ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Türkiye'den ve İtalya olmak üzere toplamda 25 adet zeytin ağacından temin edilen yapraklar analiz edilmiştir. Analiz örnekleri arasında toplam fenol ($49,36 \pm 0,65$ mg GAE/g km), toplam flavonoid ($3,63 \pm 0,28$ mg QE/g km) ve oleuropein ($49,65 \pm 0,40$ mg/g km) içeriği bakımından en yüksek sonuçları İtalya'dan toplanan Peranzana çeşidinden hazırlanan ekstrakt vermiştir. Antioksidan aktivite sonuçlarına göre en yüksek CUPRAC ($162,86 \pm 7,85$ mg TE/g km) ve en düşük IC₅₀ değeri ($0,29 \pm 0,02$ mg/mL) yine Peranzana örneğinde belirlenmiştir.

Listeria innocua ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonu için, antimikrobiyal ajan olarak ZYE ve ZYE yüklü niozomların kullanımı araştırılmıştır.

Niozomlar, lipid film hidrasyon yöntemi ve ultrases destekli boyut küçültme tekniği ile hazırlanmıştır. Formülasyonda lipid olarak Span 60 ve kolesterol, etken madde olarak ise liyofilize ZYE 1:1:1 (w/w) oranında kullanılmıştır. ZYE yüklü niozomlar morfolojik olarak incelenmiş ve enkapsülasyon verimi (%41,92±0,81), ortalama partikül boyutu (2,66±1,25 µm) ve zeta potansiyeli (-34,16±6,48 mV) belirlenmiştir.

Seçilmiş patojenler için ZYE, ZYE yüklü ve boş niozomların minimum inhibitör konsatrasyonları (MIK) mikrodilüsyon metoduyla incelenmiştir. ZYE için sonuçlar *E. coli*, *S. typhimurium* ve *L. innocua*'ya karşı MIK değerinin 150 mg (3,4 mg oleuropein içermekte)/mL olduğunu göstermiştir. Malesef, ZYE yüklü niozomlar [150 mg (229,6 µg, oleuropein içermekte)/ml] patojenler üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir. Ancak, MRSA'ya karşı ZYE'nin [2,34 mg (70,6 µg oleuropein)/mL] ve ZYE yüklü niozomların [150 mg (229,6 µg oleuropein içermekte)/mL] MIK değerleri diğer üç patojene göre çok daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak, ZYE yüklü niozomlar, MRSA'nın kontrolünde yeni bir antimikrobiyal taşıma sistemi olarak umut verici bir değere sahiptir.

Anahtar sözcükler: Enkapsülasyon, Niozom, Zeytin Yaprığı Ekstraktı, Antioksidan Aktivite, Antimikrobiyal Aktivite, Gıda Kaynaklı Patojen.

ABSTRACT

NIOSOMAL ENCAPSULATION OF OLIVE LEAF EXTRACT AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Aygül CAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Science Department of Food Engineering

Advisor: Assist. Prof. Çiğdem UYSAL PALA

16/08/2017, 92

Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves are nutraceutically valuable raw materials that contain high amount of phenolic phytochemicals, especially Oleuropein. Oleuropein and other phenolics in the olive leaf extract (ZYE) have significant potential as natural antimicrobials in food sector. Unfortunately, bitter taste of ZYE limits its usage. Niosomal microencapsulation technique has some advantages such as masking the bitter taste and improving the diffusion of antimicrobial agent to food or a bacterial cell. The main aim of the study is to determine oleuropein content and antioxidant properties of ZYE obtained leaves from different cultivars of olive tree and to investigate the use of ZYE and ZYE loaded niosomes as antimicrobial agents.

25 samples collected from Turkey and Italy were analyzed in order to determine the antioxidant activity of ZYE. In all varieties, ZYE made from Peranzana had the highest total phenol ($49,36 \pm 0,65$ mg GAE/g dw), flavonoid ($3,63 \pm 0,28$ mg QE/g dw) and oleuropein ($49,65 \pm 0,40$ mg/g dw) content. The highest CUPRAC ($162,86 \pm 7,85$ mg TE/g dw) and the lowest IC₅₀ value of (0.29 ± 0.02 mg/mL) were also determined in Peranzana according to antioxidant activity results.

ZYE and ZYE encapsulated niosomes as an antimicrobial agent for the inhibition of foodborne pathogens, including *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are investigated.

Niosomes are prepared using lipid film hydration method followed by ultrasound-assisted size reduction technique. The ratios of lipids (Span 60 and cholesterol) and active (ZYE) was 1:1:1 (w/w), respectively. The obtained niosomes are characterized in terms of morphology, entrapment efficiency ($41,92 \pm 0,81$ %), average particle size ($2,66 \pm 1,25$ µm)

and zeta-potential ($-34,16 \pm 6,48$ mV).

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of ZYE, ZYE loaded and empty niosomes for control strains were investigated using a micro dilution method. The results showed that MIC values of ZYE were 150 mg (contains 3.4 mg oleuropein)/mL for *E. coli*, *S. typhimurium* and *L. innocua*. Unfortunately, ZYE loaded niosomes [150 mg (contains 229,6 μ g oleuropein)/mL] did not show any antimicrobial effect on these pathogens. Conversely, MIC values of ZYE [2,34 mg (contains 70,6 μ g oleuropein)/mL] and ZYE loaded niosomes [150 mg (contains 229,6 μ g oleuropein)/mL] for MRSA were much lower than the other three pathogens. In conclusion, ZYE loaded niosomes has promising value as a novel antimicrobial delivery system to control MRSA.

Keywords: Encapsulation, Niosome, Olive Leaf Extract, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, Foodborne Pathogens.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Mikroenkapsülasyon ve Nanoenkapsülasyon	4
2.2. Niozomlar.....	5
2.2.1. Niozom tipleri.....	7
2.2.2. Niozom ve Lipozomların Karşılaştırılması	8
2.2.3. Niozom Hazırlama Yöntemleri	10
2.2.3.1. İnce Film Hidrasyon Yöntemi	10
2.2.3.2. Elde Çalkalama Yöntemi	10
2.2.3.3. Eter Enjeksiyon Yöntemi.....	11
2.2.3.4. Ters Faz Evaporasyonu Yöntemi (REV)	12
2.2.3.5. Sonikasyon.....	12
2.2.3.6. Mikro Akışkanlaştırma	13
2.2.3.7. Kabarcık Yöntemi.....	13
2.2.3.8. Isıtma Yöntemi	13
2.2.3.9. Dondurma ve Çözme Yöntemi	14
2.2.3.10. Dehidrasyon Rehidrasyon Yöntemi (DRM)	14
2.2.3.11. Trans Membran pH Gradyanı (Asidik) Etkin Madde Yükleme İşlemi/Uzaktan Yükleme	14
2.2.3.12. Proniozomlardan Niozomların Oluşumu	15
2.2.3.13. Handjani–Vila Metodu	15
2.2.4. Kapsüllenemeyen Etkin Maddeyi Ayırma Teknikleri.....	16
2.2.4.1. Diyaliz.....	16

2.2.4.2. Jel Filtrasyon.....	16
2.2.4.3. Santrifüjleme.....	17
2.2.4.4. Ultra Santrifüj	17
2.2.5. Niozom Boyutlarını Küçültme Teknikleri.....	18
2.2.6. Niozom Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	19
2.2.6.1. Yüzey Aktif Maddelerin Türü	19
2.2.6.2.1. Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB)	21
2.2.6.2.2. Kritik Ambalaj Parametresi (CPP).....	21
2.2.6.2.3. Jel Sıvı Geçiş Sıcaklığı (Tc).....	22
2.2.6.2. Yüzey Aktif Madde/Lipit ve Yüzey Aktif/Su Oranları	22
2.2.6.3. Kolesterol ve Diğer Katkı Maddeleri.....	22
2.2.7. Niozomların Karakterizasyonu.....	24
2.2.7.1. Niozomların Ortalama Vezikül Büyüklüğü, Morfolojisi ve Boyut Dağılımı	24
2.2.7.2. Enkapsülasyon Verimi (% EE)	25
2.2.7.3. Zeta Potansiyeli.....	26
2.2.7.4. Vezikül Stabilitesi.....	26
2.3. Zeytin Yaprığı Ekstraktı	27
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal	31
3.2. Deneme Planı	32
3.2.1. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Hazırlanması ve Analizleri.....	32
3.2.1.1. Zeytin Yapraklarının Kurutulması ve Öğütülmesi	32
3.2.1.2. Zeytin Yapraklarının Su ile Ekstraksiyonu.....	34
3.2.1.3. Niozom Üretimi İçin Zeytin Yapraklarının Ekstraksiyonu	34
3.2.1.4. Toplam Fenol Tayini	34
3.2.1.5. Toplam Flavonoid Tayini	35
3.2.1.6. 2,2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi	36
3.2.1.7. CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	36
3.2.1.8. Oleuropein Tayini	37
3.2.2. ZYE Yüklü ve Boş Niozomların Hazırlanması	37
3.2.2.1. Santrifüj İle Kapsüllenemeyen Etken Maddeyi Uzaklaştırılması.....	38
3.2.2.2. Enkapsülasyon Verimi Tayini	40

3.2.2.3. Niozomların Partikül Boyutlarının İncelenmesi	40
3.2.2.4. Niozomların Zeta Potansiyellerinin Tayini.....	40
3.2.2.5. Niozomların Görüntülenmesi	40
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi	41
3.2.3.1. Mikrobiyal Kültürlerin Çoğaltılması ve Saklanması	41
3.2.3.2. Mikroorganizma Konsantrasyonunun Ayarlanması	41
3.2.3.3. ZYE, Boş Kapsül ve ZYE Yüklü Kapsülün Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi	41
3.2.3.4. Toplam Canlı Sayımı	43
3.2.4. İstatistiksel Analiz	44
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	45
4.1. Farklı Çeşit Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşenleri	45
4.1.1. Farklı Çeşit Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Toplam Fenol ve Flavonoid İçerikleri	46
4.1.2. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Oleuropein İçerikleri	49
4.1.3. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Antioksidan Özellikleri	52
4.2. ZYE Yüklü ve Boş Niozomların Karakterizasyonu	55
4.3. ZYE ve ZYE Yüklü Veziküllerin Antimikrobiyal Aktivitesi	59
4.3.1. ZYE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi	59
4.3.1. ZYE Yüklü ve Boş Niozomların Antimikrobiyal Aktivitesi.....	64
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Mikroenkapsülasyon Teknolojileri Eğilimleri (Gouin, 2004).....	5
Şekil 2.2. Niozomun şematik gösterimi (Anonim, 2006).....	6
Şekil 2.3. SUV, LUV ve MLV'lerin şematik yapısı (nm) (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)	8
Şekil 2.4. İnce film hidrasyon yöntemi ile niozom eldesinin şematik gösterimi (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)	11
Şekil 2.5. Sorbitan monostearat (Span 60) tarafından hazırlanan niozomun şematik gösterimi (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)	20
Şekil 2.6. Span 60 ve kolesterolün niozomal yapıdaki şematik gösterimi (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)	23
Şekil 2.7. Zeytin yaprağının yapısı (<i>Olea europaea</i>) (Debib ve Boukhatem, 2017).....	28
Şekil 2.8. Oleuropeinin kimyasal yapısı (Andreadou ve ark., 2006).....	29
Şekil 3.1. ZYE ve liyofilize zeytin yaprağı üretim akım şeması	33
Şekil 3.2. Toplam fenol tayini için gallik asit standart eğrisi	35
Şekil 3.3. Toplam flavonoid tayini için kuersetin standart eğrisi	35
Şekil 3.4. CUPRAC tayini için Trolox standart eğrisi.....	36
Şekil 3.5. Oleuropein tayini için Oleuropein standart eğrisi.....	37
Şekil 3.6. ZYE yüklü ve boş niozomların üretim akım şeması	39
Şekil 3.7. ZYE'nin MIK değerinin belirlenmesi için hazırlanan kuyucukların şematik gösterimi	42
Şekil 3.8. ZYE yüklü kapsülün MIK değerinin belirlenmesi için hazırlanan kuyucukların şematik gösterimi	43
Şekil 3.9. <i>E.coli</i> , <i>L.innocua</i> , <i>S.typhimurium</i> için ZYE, ZYE yüklü ve boş kapsülün MIK değerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasının şematik gösterimi.....	44
Şekil 4.1. Manzanilla örneği 80°C'de 4 saat kurutma öncesi (A), sonrası (B) ve Peranzana örneği 80°C'de 4 saat kurutma öncesi (C), sonrası (D)	45
Şekil 4.2. Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin HPLC-DAD kromatogramı.....	50
Şekil 4.3. Türkiye'den toplanan zeytin yapraklarından elde edilen ZYE'lerin HPLC-DAD yöntemiyle belirlenen Oleuropein miktarı	50
Şekil 4.4. İtalya'dan toplanan zeytin yapraklarından elde edilen ZYE'lerin HPLC-DAD yöntemiyle belirlenen Oleuropein miktarı	51
Şekil 4.5. Boş ve ZYE yüklü niozomların görünümü.....	56
Şekil 4.6. Olgunlaşma sonrası (A) ZYE yüklü niozom (40x) ve Boyutlandırma sonrası (B) ZYE yüklü niozom (10x)	58
Şekil 4.7. ZYE yüklü niozomların SEM görüntüsü.....	58
Şekil 4.8. Boş niozomların SEM görüntüsü	58
Şekil 4.9. ZYE yüklü (A) ve boş (B) niozomların TEM görüntüsü	59
Şekil 4.10. MRSA'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MIK değeri	61
Şekil 4.11. <i>E.coli</i> 'ye karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MIK değeri.....	61
Şekil 4.12. <i>S.typhimurium</i> 'a karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MIK değeri	62

Şekil 4.13. <i>L.innocua</i> 'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MİK değeri	62
Şekil 4.14. MRSA'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri.....	65
Şekil 4.15. <i>E.coli</i> 'ye karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri.....	65
Şekil 4.16. <i>S.typhimurium</i> 'a karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri.....	66
Şekil 4.17. <i>L.innocua</i> 'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri.....	66
Şekil 4.18. MRSA'ya karşı boş kapsülün MİK değeri	67
Şekil 4.19. <i>E.coli</i> 'ye karşı boş kapsülün MİK değeri	67
Şekil 4.20. <i>S.typhimurium</i> 'a karşı boş kapsülün MİK değeri	68
Şekil 4.21. <i>L.innocua</i> 'ya karşı boş kapsülün MİK değeri	68



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Analiz edilen zeytin yaprağı çeşitleri	31
Çizelge 4.1. Türkiye’den toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı.....	47
Çizelge 4.2. İtalya’dan toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı.....	48
Çizelge 4.3. Türkiye’den toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin CUPRAC ve DPPH yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri.....	53
Çizelge 4.4. İtalya'dan toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin CUPRAC ve DPPH yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri.....	54
Çizelge 4.5. Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE, ZYE yüklenmiş ve boş kapsülün seçilmiş gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteleri (18 saat, 37°C).....	63

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Antioksidan, antimikrobiyal ve daha birçok fonksiyonel özellik gösteren bileşenler sağlık, kozmetik, kimyasal tarım ürünleri ve gıdalar da dâhil olmak üzere çok çeşitli endüstriyel ürünler için vazgeçilmez unsurlardır. Bu işlevsel bileşenler, polarite, molekül ağırlığı ve fiziksel durumlar gibi farklı moleküler ve fiziksel formlardan oluşur. Saf haliyle doğrudan kullanımı sınırlı olan bu bileşenler, genellikle çeşitli taşıyıcı sistemlere dâhil edilirler. Bu taşıyıcı sistemler, fonksiyonel bileşiğin işleme, depolama ve kullanım gibi aşamalarda kimyasal ve biyolojik bozulmalardan korunması, aktif bir şekilde hedeflenen alana taşınması ve salınımı tetikleyen çevresel faktörler ile salınımın kontrolü gibi birçok rol üstlenmektedir (Weiss ve ark., 2006). Nanoteknolojideki son gelişmeler, nanoparçacıkların ilaç taşıyıcıları olarak büyük bir potansiyel kazandığını kanıtlamıştır. Boyut azaltma yöntemleri ve teknolojileri, eşsiz fizikokimyasal ve biyolojik özellik gösteren farklı nanoyapıların üretimine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemler, nanoyapıları biyomedikal uygulamalar için uygun materyal haline getirmekte ve fonksiyonel bileşiklerin nanoteknolojik uygulamalar ile birlikte kullanımı sağlık ve gıda gibi birçok alanda önem kazanmaktadır (Bhatia, 2016).

Son yıllarda, ilaç taşıma sistemleri mikro/nano emülsiyonlar, lipozomlar, polimerik kapsüller ve diğer lipofilik taşıyıcılar gibi enkapsülasyon teknolojilerin kullanımıyla hızla gelişmiştir (Karewicz ve ark., 2011; Rijo ve ark., 2014; Yang ve ark., 2013; Yu ve ark., 2011). Bu teknolojilerin yanı sıra, lipozoma alternatif olarak geliştirilen niozom, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir olmakla birlikte noniyonik yüzey aktif maddeler ve kolesterol varlığında kendiliğinden oluşan veziküler sistemlerdir (Baillie ve ark., 1985; Azmin ve ark., 1985). Mikro ve nano boyutta üretimi yapılabilen niozomlar, kararlı dispersiyonlar oluşturarak, kapsüllenen etken maddenin hedeflenen bölgede kontrollü salınımını sağlamaktadır (Abdelkader ve ark., 2013; Baillie ve ark., 1985; Şahin, 2007). Lipozomlarla karşılaştırıldığında ise kimyasal kararlılığının ve stabilitesinin daha yüksek olması, düşük maliyetleriyle endüstriyel üretime uyarlanabilmesi, depolama ve sterilizasyon kolaylığı gibi çeşitli avantajlarıyla dikkat çekmektedir (Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu ve Vyas, 1998; Şahin, 2007; Stan ve ark., 2013; Baillie ve ark., 1985).

Fonksiyonel bileşiklerin niozom tekniğiyle enkapsülasyonu sonucunda, bileşiklerin antimikrobiyal (Patel ve ark., 2014) ve antioksidan aktivitelerinin (Liang ve ark., 2016) arttığı ve stabilitelerinin iyileştiği (Ruksiriwanich ve ark., 2014) bildirilmiştir. Diğer yandan,

lipozom teknolojisi terapötik maddenin hoş olmayan tadını maskelemek için kullanılmaktadır (Sajal ve ark., 2008).

Akdeniz ülkelerinde ekonomik ve sosyal önemiyle öne çıkan zeytin ağacı (*Olea europaea* L.), yağ, meyve ve yapraklarının zengin fenolik bileşen içeriğiyle yüksek antioksidan aktivite gösteren türlerden biri olarak kabul görmüştür (Jemai ve ark., 2009; Tabera ve ark., 2004). Geniş bir dağılıma sahip olan fenolik bileşikler, bitkilerde doğal olarak bulunan önemli gruplardan biridir (Silva ve ark., 2006). Fenolik bileşiklerin fonksiyonel özelliklerine olan ilgi sonucu, zeytin ağacı ve zeytin ağacının diğer bölümleri incelenmiştir. Zeytin ağacının yan ürünlerinden biri olan zeytin yaprağı zeytinyağı endüstrisinde yüksek miktarda bulunmakta ve fenolik bileşiklerin zengin bir kaynağı olarak dikkat çekmektedir (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012).

Oleuropein, zeytin meyvelerinde ve özellikle yapraklardaki ana fenolik bileşenlerden biridir (Esti ve ark., 1998). Zeytin ağacı ve ürünlerinde genel olarak oleuropein mevcut olsa da yapraklar meyvelerden daha yüksek toplam fenol ve oleuropein konsantrasyonuna sahiptir (Petridis ve ark., 2012). Geleneksel tıbbın önemli girdilerinden birisi olan zeytin yaprağının ilk olarak ekstrakt şeklinde, sıtma ve ateşli hastalıklarla mücadele amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir. Yapılan pekçok çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktının (ZYE) ve yapraktan türetilmiş fenolik bileşiklerin antioksidan, anti-hipertansif, antidiyabetik anti-inflamatuar, antiaterojenik, antiketojenik ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Ahmed ve ark., 2014; Benavente-García ve ark., 2000; Cicerciale ve ark., 2010).

Gıda güvenliği gıda endüstrisinde son dönemde oldukça kaygılanılan konulardan biridir ve sentetik koruyucular yerine doğal koruyucu maddelerin kullanımı üzerine fazlasıyla odaklanılmaktadır. Tüketicilerin doğal, katkısız gıda maddeleri arayışı gıda maddelerinin muhafazasında doğal antimikrobiyallerin araştırılmasını giderek arttırmaktadır (Akarca ve ark., 2014). Doğal antimikrobiyal maddelerin stabilitesinin arttırılması, acı tatlarının maskelenmesi, uygulanacak gıda maddelerine ve/veya patojen bakteri hücrelerine difüzyon özelliklerinin geliştirilmesi vd. pekçok amaç dâhilinde uygun mikroenkapsülasyon tekniklerinin kullanılması ise son yılların popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır.

Bu çalışmanın amacı, farklı kültür çeşidi zeytin ağaçlarının yapraklarından elde edilen ekstrakt (ZYE)'in oleuropein içerikleri ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi, niozomal enkapsülasyon tekniği ile ZYE'nin kapsüllenmesi ve ZYE ile ZYE yüklü niozomların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesidir. Çalışma kapsamında, ZYE'nin niozomal enkapsülasyon tekniği kullanılarak ilk defa kapsüllenmesi ve elde edilen kapsüllerin

antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi hazırlanan bu çalışmaya özgünlük kazandırmaktadır.



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Mikroenkapsülasyon ve Nanoenkapsülasyon

Enkapsülasyon, küçük katı partikül, sıvı damlacık veya gaz formda aktif bileşenlerin dış ortamdan korunması amacıyla polimer materyallerle kaplanması ile içeriğindeki aktif bileşeni belirli koşullar altında kontrollü olarak serbest bırakabilen, istenilen boyutlarda kapsüllerin oluşturulması işlemi olarak tanımlanabilir (Thies,2005; Ghosh, 2006; Arshady, 1993; Bansode ve ark., 2010; Desai ve Park, 2005; Shekhar ve ark., 2010). Kaplanan bileşen çekirdek, aktif ajan, öz, dolgu, iç faz veya faydalı yük olarak, çekirdek materyalin kaplanması için kullanılan ikincil materyal ise enkapsülant, duvar, matriks, dış faz, membran, taşıyıcı veya kabuk olarak adlandırılmaktadır (Thies, 2005; Fang ve Bhandari, 2010; Risch, 1995).

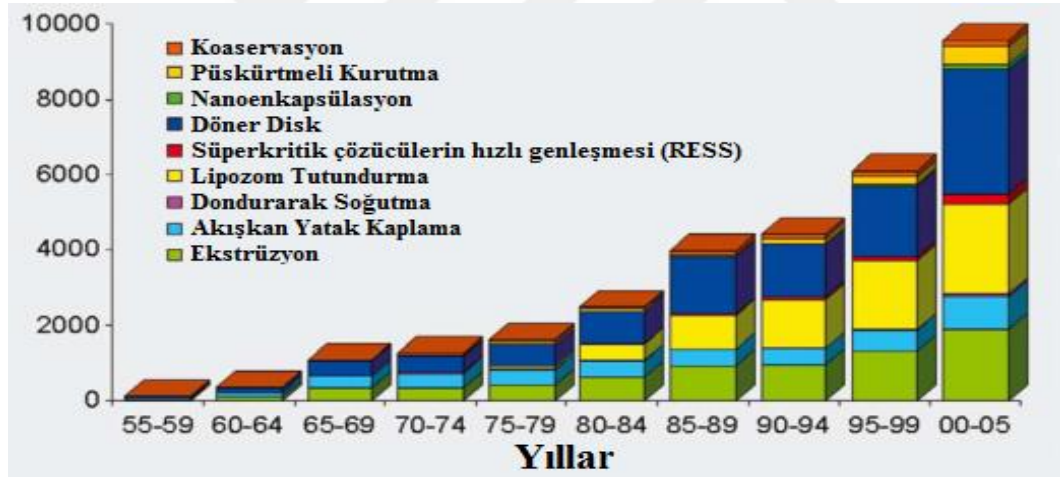
Birçok aktif bileşenin kapsüllenebildiği enkapsülasyon yöntemlerinde, çok yönlü duvar materyalleri ile teknolojileri geliştirilmiş olup son derece geniş bir yelpazede işlevsellik elde edilebilmektedir. pH değişimi (enterik ve anti-enterik kaplama), mekanik stres, sıcaklık, enzimatik aktivite, zaman, ozmotik kuvvet gibi mekanizmalar kapsülden bileşenin salınımını için kullanılabilmektedir (Gouin, 2004).

10-1000 nm arasında değişen farklı morfoloji ve içyapıya sahip kolloid boyuttaki parçacıklar olan nanopartiküller, nanokapsüller, nanoküreler nanoenkapsülasyon yöntemleriyle elde edilmektedir. Mikroenkapsülasyon teknikleriyle üretilen 3-800 µm çap aralığındaki parçacıklar mikropartiküller, mikrokapsüller, mikroküreler olarak, 1000 µm'den büyük tanecikler ise makropartikül, makrokapsül veya mikrogranül olarak bilinmektedir (Thies, 2005; Denis, 2006; Jyothi ve ark., 2010; Ezhilarasi ve ark., 2013; Lopez-rubio ve Lagaron, 2006).

Herhangi bir biyoaktif bileşiğin vücutta hedeflenen bölgeye taşınması, parçacık boyutundan doğrudan etkilenmektedir (Ezhilarasi ve ark., 2013). Büyük parçacıklar genellikle, kapsüllenmiş bileşiklerin salınımını daha yavaş ve daha uzun periyotlarda gerçekleştirmektedir. Parçacık boyutunun azaltılması adezyon kuvvetinin artması ve gastrointestinal geçiş süresinin uzatılması gibi biyoadezyon iyileştirme faktörlerini ortaya çıkararak daha fazla ilaç biyoyararlanımı sağlamaktadır (Chen ve ark., 2006). Bu nedenle, nanoenkapsülasyon sistemleri, mikroenkapsülasyon ile kıyaslandığında biyoyararlanımı artırma, kontrollü salınımı iyileştirme ve biyoaktif bileşiklerin hassas bir şekilde hedeflendirilebilmesi açısından daha büyük potansiyele sahiptir (Mozafari ve ark., 2006).

Nanoenkapsülasyon sistemleri, kullanım kolaylığı, stabilitenin artırılması, oksidasyona karşı koruma, uçucu bileşenlerin tutulması, tat maskeleymesi, nem ve pH tetiklemeli kontrollü salınım, ardışık olarak birden fazla aktif bileşenin dağılımı, lezzet karakterinde değişiklik, uzun süren organoleptik algılama ile kan ve hücrel tutulumun uzatılması da dahil olmak üzere sayısız faydalar sunmaktadır (Anandharamakrishnan, 2014; Kumari ve ark., 2014).

Biyoaktif bileşenlerin (polifenoller, mikro besinler, enzimler, antioksidanlar ve nutrasötikler) enkapsülasyonu, farmasötik ve gıda endüstrisi gibi alanlarda çok sayıda potansiyel uygulaması olan ve hızla genişleyen bir teknolojidir (Ezhilarasi ve ark., 2013; Mozafari ve ark., 2006). Bu tekniklerin kullanımı ile mikro besinlerin optimum dozajları sağlanmakta ve etkinliği artmakta, gıda içeriklerinin uygulama yelpazesini genişletmekte ve böylece ürünlerin maliyet etkinliği artırılmaktadır. Lipit bazlı nanoenkapsülasyon sistemleri, hızla gelişmekte olan nanoteknoloji alanında en umut verici kapsülleme teknolojileri arasındadır (Mozafari ve ark., 2006).



Şekil 2.1. Mikroenkapsülasyon Teknolojileri Eğilimleri (Gouin, 2004)

Şekil 2.1’de mikroenkapsülasyon teknolojilerine artan ilgi 1950’li yılların ortalarından bu yana, yayınlanan yayın sayısının (bilimsel olmayan ve bilimsel makaleler ve patentler) üstel olarak artışıyla gösterilmiştir (Gouin, 2004).

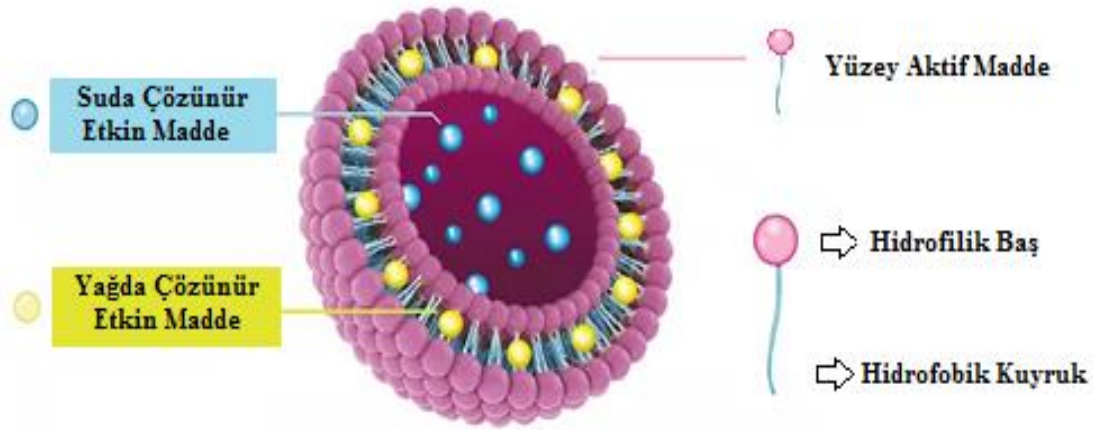
2.2. Niozomlar

İlk niozom formülasyonları, 1975 yılında L’Oreal tarafından geliştirilmiş ve patentlenmiştir (Şahin, 2007). Handjani-Vila ve ark. (1979), veziküler sistemlerin, kolesterol ve tek alkil zincirli iyonik olmayan yüzey aktif maddenin hidratasyonu ile oluşumunu ilk

olarak bildirmişlerdir (Diljyot, 2012; Baillie ve ark., 1985).

1980'den bu yana eczacılık, kozmetik ve gıda endüstrisinde niozom uygulaması ile ilgili 1200'den fazla araştırma makalesi, yaklaşık 200 patent ve 6 klinik çalışma yayınlanmıştır ve niozomlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Marianecchi ve ark., 2014).

Niozomlar, alkil veya dialkil poligliserol eter sınıfının iyonik olmayan yüzey aktif madde, yük indükleyici madde ve kolesterolün sulu ortamdaki hidratasyonu ile oluşturulan mikroskobik katmanlı yapılardır (Pirvu ve ark., 2010; Baillie ve ark., 1985; Bhatia, 2016; Uchegbu ve Florence, 1995; Şahin, 2007). Yüzey aktif madde molekülleri, hidrofobik kısımlar sulu çözücüden uzaklaştırılmış olarak birbirlerine dönük, hidrofilik başlıklar sulu çözücü ile temas halinde olacak şekilde çift katmanlı oluşturma eğilimindedir (Diljyot, 2012).



Şekil 2.2. Niozomun şematik gösterimi (Anonim, 2006)

Niozomun benzersiz yapısı hem hidrofilik hem de lipofilik biyoaktif bileşenlerin yüklenebilme yeteneğine sahip etkili bir yeni ilaç dağıtım sistemi sunmaktadır (Bhatia, 2016; Manosroi ve ark., 2008). Temelde, bu iyonik olmayan veziküller kendiliğinden oluşmazlar. Termodinamik olarak kararlı veziküllerin oluşumu, yalnızca yüzey aktif maddelerin ve kolesterol gibi membranı stabilize eden bir maddenin uygun karışımlarının varlığında gerçekleşir (Azmin ve ark., 1985; Azmin ve ark., 1986; Şahin, 2007). Bu karışımın hidratasyonu sonucunda su ile hidrofobik grup arasındaki yüksek ara yüzey gerilimi bu grupların birleşmesini sağlamak ve veziküller elde edilmektedir (Uchegbu ve Florence, 1995). Isı ve fiziksel karıştırma (Baillie ve ark., 1985) gibi enerji girdileri ile denoniyonik yüzey aktif maddeler, sulu ortamda amfifilik özelliklerine dayanarak kapalı çift katlı veziküller oluşturulabilmektedir (Diljyot, 2012; Şahin, 2007).

Eşzamanlı olarak baş grupları arasındaki sterik, hidrofilik ve/veya iyonik itme

kuvvetleri, bu grupların su ile temas etmesini sağlar. Bu iki karşıt kuvvet, bir süper moleküler montaja neden olur (Uchegbu ve Florence, 1995). Yüzey aktif madde molekülleri arasında Van der Waals kuvvetleri, yüklü yüzey aktif madde molekül grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanan itici güçler, yüzey aktif madde baş gruplarının entropik itme kuvvetleri, kısa etkili itme kuvvetleri gibi çeşitli kuvvetler vezikülü içten etkilemektedir. Bu kuvvetler, niozomların vezikül yapısının korunmasından sorumludur (Diljyot, 2012).

Veziküllerin özellikleri, üretim metotları, veziküllerin kompozisyonu, ebadı, katmanlılık, yüklenen hacim, yüzey yükü ve konsantrasyonuna bağlı olarak değiştirilmektedir (Diljyot, 2012; Bhatia, 2016).

Niozomlar yapı, morfoloji ve boyut açısından çok yönlüdür. Fiziksel özellikleri başta olmak üzere pek çok açıdan lipozomlara benzemektedir. Lipozomlar için amfifatik lipid ve niozomlar için iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluşan küresel veziküller bir veya daha fazla iç içe çift tabakada düzenlenebilmekte, lipofilik veya hidrofilik maddeleri hapseden tek katmanlı veya çok katmanlı yapılar (Şekil 2.2) oluşturulmaktadır (Rajera ve ark., 2011; Abdelkader ve ark., 2013; Sonia ve ark., 2012; Baillie ve ark., 1985; Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu, 2005; Manosroi ve ark., 2008). Bu yapılar tek katmanlı, oligolamel veya multilamellar veziküller olarak formüle edilebilir (Abdelkader ve ark., 2013).

2.2.1. Niozom tipleri

Çoğu niozom, nano veya sub-mikron (kolloidal) boyut aralığındadır (Kaur ve ark., 2004). Niozomlar, çift katmanlı tabakanın sayısının bir fonksiyonu veya boyutun bir fonksiyonu olarak sınıflandırılır.

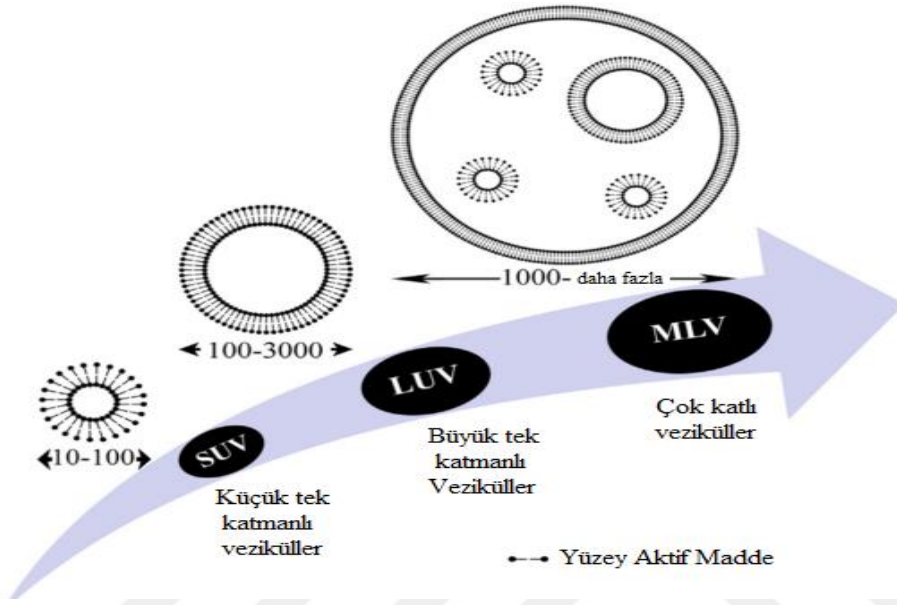
Niozomlar veziküllerin büyüklüğüne göre üç gruba ayrılabilir: (Kaur ve ark., 2012; Sonia ve ark., 2012; Shakya ve Bansal, 2014).

Çok katmanlı Veziküller (MLV): Sulu lipit bölmesini ayrı ayrı çevreleyen çok sayıda çift katmandan oluşur. Bu veziküller yaklaşık olarak 0,5 - 10 µm çapındadır. Bu veziküller, lipofilik bileşikler için ilaç taşıyıcı olarak oldukça uygundur.

Büyük tek katmanlı veziküller (LUV): Bu tipteki niozomlar, yüksek sulu/lipit bölüm oranına sahiptir. Membran lipitlerinin ekonomik bir şekilde kullanılması ile daha büyük hacimlerde biyoaktif materyal kapsüllenebilmektedir. Bu veziküllerin boyutları 0,10-3 µm aralığındadır.

Küçük tek katmanlı veziküller (SUV): Bu küçük tek katlı veziküller çoğunlukla

sonikasyon yöntemi, Fransız pres ekstrüzyon yöntemi veya homojenizasyon yöntemi ile çok katmanlı veziküllerden hazırlanır. Küçük tek katmanlı veziküllerin yaklaşık boyutları 0,025-0,05 μm çapındadır. Termodinamik olarak kararsızdırlar ve agregasyona ve füzyona duyarlıdırlar. Kapsül içinde tutundurulanan aktif madde hacmi azdır ve sulu çözünen maddenin yüzdesel tutunması düşüktür (Shakya ve Bansal, 2014; Khindri ve ark., 2015).



Şekil 2.3. SUV, LUV ve MLV'lerin şematik yapısı (nm) (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)

Literatürde, proniozom, elastik niozomlar, polihedral niozomlar, diskinler (disk şekilli vezikül), aspozom (askorbil palmitat vezikül), yüzey aktif madde etozomları ve benzeri dahil olmak üzere, boyuta dayalı kategorizasyona ek olarak, birçok uzmanlaşmış niozom açıklanmıştır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

2.2.2. Niozom ve Lipozomların Karşılaştırılması

Lipozomlar ve niozomlar gibi iki kutuplu veziküller, ilaçlar, vitaminler ve kozmetik için etkin ve sofistike dağıtım sistemleri olarak yaygın olarak bilinmektedir (Manosroi ve ark., 2008). Hidrofilik, lipofilik ve aynı zamanda amfifilik bileşenlerin yüklenebildiği niozomlar başlangıçta lipozomlara alternatif bir kontrollü ilaç dağıtım sistemi olarak geliştirilmiştir (Azmin ve ark., 1985; El Maghraby ve Williams, 2009; Şahin, 2007). Niozomlar yüklenmemiş tek zincirli yüzey aktif madde ve kolesterolden hazırlanırken lipozomlar çift zincirli fosfolipitlerden (nötr veya yüklü) ve kolesterolden hazırlanır ve niozomlar arasında karakteristik farklılıklar mevcuttur (Bhatia, 2016).

Niozomların oluşturulmasında biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin ve ekipmanların düşük maliyetli olması, ilaç ve kozmetik gibi uygulamalarda niozomların endüstriyel ölçekli üretilmesi, stabilitesi, kolay depolanması ve sterilizasyonu bu bileşiklerin fosfolipitlere alternatif olarak kullanılmasını sağlamıştır (Şahin, 2007; Diljyot, 2012; Stan ve ark., 2013; Baillie ve ark., 1985; Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu ve Vyas, 1998; Bhatia, 2016).

Niozomların lipozomlarla karşılaştırıldığında en önemli özelliklerinden biri kimyasal kararlılığıdır. Niozomlar, fosfolipitlere kıyasla kimyasal bozunmaya veya oksidasyona karşı daha dirençlidir (Stan ve ark., 2013; Diljyot, 2012). Oda sıcaklığında dengeli ve ışığa daha az duyarlıdır. Bu özelliklere bağlı olarak daha uzun bir raf ömrüne sahiptirler (Baillie ve ark., 1985; Abdelkader ve ark., 2013; Şahin, 2007). Niozomlar ozmotik olarak da aktif ve dengelidir (Baillie ve ark., 1985). Lipozomlar ise özel depolama ve işleme gerektirir ve doğal fosfolipitlerin saflığı değişkendir (Mukherjee ve ark., 2007; Nasr ve ark., 2008; Bhatia, 2016; Diljyot, 2012). Bununla birlikte, hem lipozomlar hem de niozomlar fiziksel stabilite problemlerini eşit derecede gösterebilir. Vezikül agregasyonu, iki katmanlı füzyon ve ilaç sızıntısı karşılaşılan en yaygın fiziksel değişikliklerdir (Abdelkader ve ark., 2013).

Lipozomlardaki kolesterol konsantrasyonu niozomlardan çok daha fazladır. Sonuç olarak, lipozomların aktif maddeyi tutma verimi, niozomlardan çok daha az olur (Bhatia, 2016; Diljyot, 2012). Çift katmandaki kolesterolün araya eklenmesinin, formülasyon sırasında tutundurma hacmini ve dolayısıyla tutundurma etkinliğini azalttığı bildirilmektedir (Bhatia, 2016).

Lipozomlar ve niozomlar gibi kolloidal ilaç dağıtım sistemleri klasik dozaj formlarına kıyasla belirgin avantajlara sahiptir (Şahin, 2007). Sabit parçacık boyutlu niozomlar, fiziksel olarak kararlı dispersiyonlar oluşturarak tutulan ilacın kontrollü salınımı ile dolaşımını uzatır, organ dağılımı ve metabolik stabilitesini değiştirir, ilacın terapötik performansını artırır (Abdelkader ve ark., 2013).

Çeşitli çalışmalar niozomların lipozomlar gibi *in vivo* şekilde davrandıklarını, kapsüllenen ilacın dolaşımını uzattığını ve organ dağılımını ve metabolik stabilitesini değiştirdiklerini göstermektedir (Uchegbu ve Florence, 1995; Azmin ve ark., 1985; Baillie ve ark., 1986; Hunter ve ark., 1988; Carter ve ark., 1988; Bhatia, 2016). Ek olarak, kompozisyonlarının veya yüzeyinin modifikasyonu ile ilacın istenen hareket alanına yönlendirilmesi ve/veya serbest bırakılmasının kontrol edilmesi beklenebilir (Baillie ve ark., 1985; Şahin, 2007).

Niozomlar, vezikül süspansiyonlarında topaklaşmaya karşı daha fazla koruma

sağlamak için stearilamin ve disetilfosfat gibi çeşitli iyonik amfifiller ile formüle edilebilirler (Uchegbu ve Florence, 1995). Lipozomlar bazen bulanıklık oluşturdıkları için iyonik olmayan bir yüzey aktif madde bileşeni dahil edilerek de hazırlanabilmektedir (Uchegbu ve Florence, 1995).

Niozomlar ilaçların oral, parenteral ve topikal yollarla etki alanına ulaşmak için kullanılmaktadır. İlaçların oral biyolojik kullanılabilirliğini ve cilt nüfuzunu artırabilir (Şahin, 2007). Biyomoleküllerin dağılımında niozomların kullanımı ile ilgili güncel görüşler anti-AIDS ilaçları, anti-kanser ilaçları ve anti-viral ilaçlar gibi toksik ilaçların kapsüllenmesiyle ilgili doğrulanmamıştır. İlaç kapsüllemeye niozomlar, nispeten toksik ve uygun olmayan iyonik ilaç veziküllerine kıyasla umut verici bir taşıyıcı sistem sunmaktadır (Bhatia, 2016; Uchegbu, 2005).

2.2.3. Niozom Hazırlama Yöntemleri

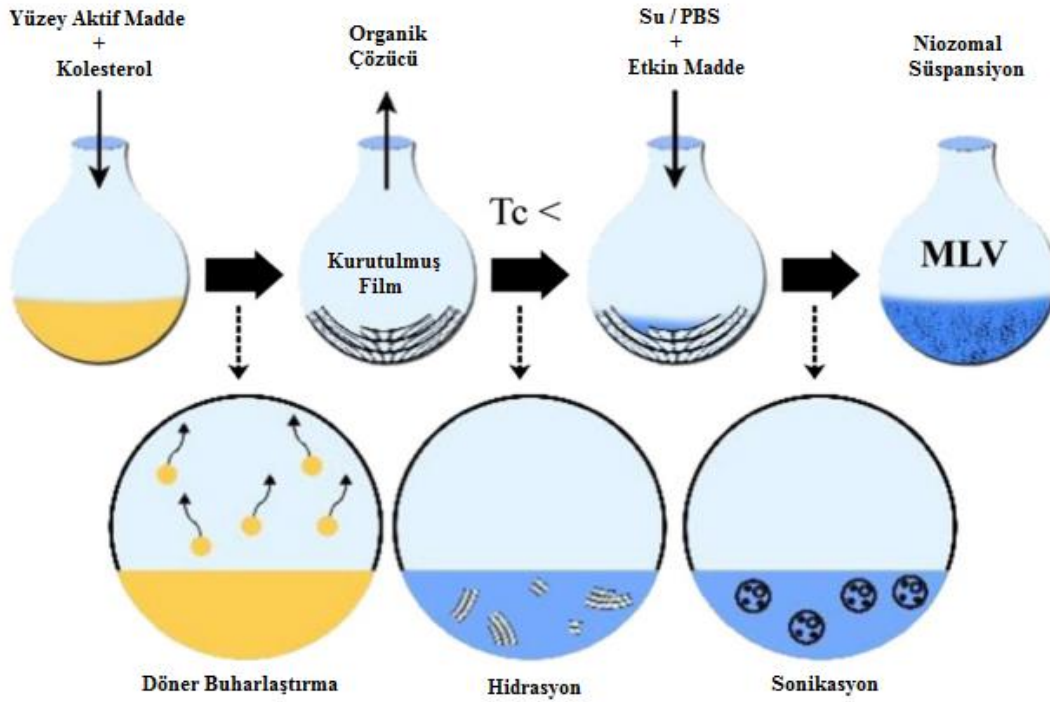
2.2.3.1.İnce Film Hidrasyon Yöntemi

Bu yöntem yaygın olarak ince film hidrasyon (TFH) veya klasik yöntem olarak bilinmektedir (Şekil 2.4). TFH yöntemi daha önce (Bangham ve ark. (1965) tarafından lipozomların hazırlanması için tarif edilmiştir. Yüzey aktif madde ve kolesterol yuvarlak tabanlı bir şişe içerisinde uçucu bir organik çözücü (dietil eter, kloroform veya metanol) ile çözündürülür. Döner vakumlu buharlaştırıcı ile organik çözücü buharlaştırılarak şişenin iç duvarında ince film oluşturulur. Organik çözücünün tamamen uzaklaştırıldığı ince filme kapsüllenecek maddeyi içeren su veya PBS (fosfat tamponu salin) gibi bir sulu çözelti eklenerek ince lipid filmi yüzey aktif maddenin faz geçiş sıcaklığının üzerinde hidrasyon işlemi uygulanır. TFH yönteminde oluşturulan niozomlar çok katlı veziküllerdir. MLV'ler için ilacın yüklenme verimi düşüktür (Diljyot, 2012; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Uygulanması kolay bir yöntem olmasına rağmen organik solvent kullanımı yöntemin dezavantajı olarak gösterilmektedir (Azmin ve ark., 1985). Klotrimazol (Ning ve ark., 2006), naltrekson hidroklorür (Abdelkader ve ark., 2010), andrografolid (Tu ve ark., 2014) niozomları film hidrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır.

2.2.3.2. Elde Çalkalama Yöntemi

MLV'lerin hazırlanması için kullanılan elde çalkalama yöntemi TFH metoduna benzemektedir ve bu benzerlikten dolayı aynı kategoriye konulabilmektedir (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Bu yöntemde, yüzey aktif maddeler ve kolesterol gibi bazı katkı maddeleri yuvarlak tabanlı bir şişe içerisinde organik bir çözücü (eter, kloroform, benzen

vb.) içerisinde çözündürülür. Organik çözücü, şişenin iç duvarında film oluşturmak üzere bir döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmaktadır. Tamamen kurutulmuş film, yumuşak bir mekanik sallama ile yaklaşık 1 saat ilaç içeren su veya PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) gibi bir sulu çözelti eklenerek hidratlanır ve süt görünümlü niozomal dispersiyon oluşturulur. Veziküller içerisinde tutulan sıvı hacmi küçüktür. (Baillie ve ark., 1985; Rangasamy ve ark., 2008; Rajera ve ark., 2011). Silymarin (El-Ridy ve ark., 2012), dialil sülfid (Alam ve ark., 2009), asiklovir (Rangasamy ve ark., 2008) niozomları elde çalkalama yöntemiyle hazırlanmıştır.



Şekil 2.4. İnce film hidrasyon yöntemi ile niozom eldesinin şematik gösterimi (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)

2.2.3.3. Eter Enjeksiyon Yöntemi

Bu yöntem Deamer ve Bangham tarafından 1976'da bildirilmiştir (Nasir ve ark., 2012). Yüzey aktif madde ve kolesterol karışımı dietil eterde çözülür ve kullanılan organik çözücünün kaynama noktasının üstünde ısıtılan (40-60°C) sulu faza dar bir iğne yardımıyla yavaşça enjekte edilerek veziküller elde edilir (Baillie ve ark., 1985; Rangasamy ve ark., 2008). Eter buharlaştırılırken enjeksiyon ve karıştırma hızı değiştirilerek MLV (Gopinath ve ark., 2001), SUV (Nasir ve ark., 2012; Rajera ve ark., 2011) gibi farklı büyüklük ve homojenliğe sahip niozomlar oluşturulabilir (Aggarwal ve ark., 2004). Bu yöntemle elde

edilen niozomların boyutu 50-1000 µm arasında değişmekte olup, boyut esasen formülasyon değişkenlerine ve deney koşullarına bağlıdır (Rajera ve ark.,2011; Diljyot, 2012). Organik solvent, döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırılmıştır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Alternatif olarak, eter yerine petrol eteri, etil metil eter veya diklorometan veya metanol ile kombine bir şekilde solvent seçimi yapılabilmektedir (Devaraj ve ark., 2002). Termoplastik ilaçlar için eter yerine daha düşük sıcaklıklarda buharlaşabilen fluorinat hidrokarbonlar kullanılabilir (Rajera ve ark., 2011). Yöntemin dezavantajı solventin ortamdan tam olarak uzaklaştırılamamasıyla kapsüllenecek maddenin yapısının bozulmasıdır (Nasir ve ark., 2012). Adriamisin (Kerr ve ark., 1988), karboksifluorescein (Baillie ve ark., 1985), asiklovir (Rangasamy ve ark., 2008) niozomları eter enjeksiyon yöntemiyle hazırlanmıştır.

2.2.3.4. Ters Faz Evaporasyonu Yöntemi (REV)

Bu yöntemde, kolesterol ve yüzey aktif maddeler organik çözücü (eter ve kloroform) karışımında çözündürülür. Kapsüllenecek maddenin çözündürüldüğü bir sulu faz karışıma eklenir ve emülsiyon oluşturmak üzere bu iki fazın karışımı 4-5°C'de sonike edilir. Berrak jele PBS ilave edilerek tekrar sonike edilir. Sonikasyon işlemini takiben, yaklaşık 40-60°C'de bir döner vakumlu buharlaştırıcı yardımıyla organik faz uzaklaştırılır. Elde edilen viskoz niozom süspansiyonu PBS ile seyreltilir ve 60°C'de su banyosunda 10 dakika ısıtılarak niozomların oluşması sağlanır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014; Diljyot, 2012; Rajera ve ark., 2011). REV yöntemi ile üretilen veziküller tek katmanlı veya oligolameldir ve TFH yöntemine kıyasla nispeten daha üniformdur (Szoka ve Papahadjopoulos, 1978; Abdelkader ve ark., 2013). Naltrekson hidroklorür (Abdelkader ve ark., 2011) ve asetazolamid (Aggarwal ve ark., 2004) niozomları ters faz tekniği ile üretilmiştir.

2.2.3.5. Sonikasyon

Cable tarafından 1989 yılında tarif edilen sonikasyon uygulaması tipik niozom üretim yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde tompon içerisindeki ilaç solüsyonu 10 ml'lik bir cam vial içindeki yüzey aktif madde ve kolesterol karışımına eklenir. Karışım, niozomların elde edilmesi için titanyum problu bir sonikatör kullanarak 60°C'de sonike edilir (Baillie ve ark., 1986; Verma ve ark., 2010). Dialil disülfid (Alam ve ark., 2013) ve hidroksi kamptotesin (Fang ve ark., 2006) yüklü niozomların hazırlanması için sonikasyon yöntemi kullanılmıştır.

2.2.3.6. Mikro Akışkanlaştırma

Mikro akışkanlaştırma, tanımlanmış boyut dağılımına sahip tek katmanlı veziküllerin hazırlanması için kullanılan yeni bir tekniktir. Bu yöntem, iki akışkan akışın etkileşim haznesinde kesin olarak tanımlanmış mikro kanallarda ultra yüksek hızlarda etkileşime girdiği dalgıç jet prensibine dayanır. Ortak bir kenar boyunca ince sıvı tabakanın çarpması ile sisteme verilen enerji niozom oluşumu alanı içinde kalacak şekilde düzenlenmiştir. Mikro akışkanlaştırma tekniği kullanılarak daha büyük tekdüzelik, daha küçük boyut, tek katmanlı veziküller ve daha iyi niozom çoğala bilirliliği elde edilebilir (Lo ve ark., 2010; Verma ve ark., 2010; Sorgi ve Huang, 1996).

2.2.3.7. Kabarcık Yöntemi

Yüzey aktif madde/lipit karışımının homojenleştirilmesi ve ardından bu karışımdan azot gazı altında köpürtülmesi prensibine dayanan kabarcık yöntemi organik çözücüler kullanılmadan lipozomların ve niozomların hazırlanması için yeni bir tekniktir. Kabarcıklandırma ünitesi, sıcaklığı kontrol etmek amacıyla su banyosunda konumlandırılan üç boyunlu yuvarlak tabanlı bir şişeden oluşmaktadır. Veziküllerin oluşumu sırasında su kaybını önlemek için, su soğutmalı geri akış kolonu şişenin orta boynuna bağlanır. İkinci boynuna sıcaklık kontrolü için bir termometre yerleştirilir. Azot kaynağı üçüncü boyun içerisinden geçirilir. Yavaşça yüksek basınç ile 1 cm² yüzey alanına sahip sinterlenmiş cam filtreden azot gazı zorlanarak balonun tabanında sürekli bir gaz kabarcıkları akışı üretilir. Gaz kabarcıklandırma aşamasından önce, kolesterol ve yüzey aktif madde tampon çözeltiye ilave edilir ve bir homojen hale gelmesi için 30 dakika karıştırılır. Hazırlanan vezikül dağılımı 0,2-0,5 µm arasında değişmektedir. Homojenleştirme basamağının atlanmasının partikül boyutunu etkilemediği bildirilmiştir fakat daha uzun bir kabarcıklandırma süresi gerekmektedir (Talsma ve ark., 1994; Abdelkader ve ark., 2013).

2.2.3.8. Isıtma Yöntemi

Mozafari, 2005 tarafından patentlenmiş ısıtma yöntemi toksik olmayan, ölçeklenebilir ve tek adım bir yöntemdir. İyonik olmayan yüzey aktif madde, kolesterol ve/veya yük indükleyici moleküllerin karışımları gliserol gibi bir poliol varlığında sulu bir ortama eklenerek hidratlanır. Karışım düşük hızlarda karıştırılarak veziküller oluşana kadar ısıtılır (Şahin, 2007). α-tokoferol (Basiri ve ark., 2017) ve latanoprost (Aswathy ve John, 2014) niozomları ısıtma yöntemiyle hazırlanmıştır.

2.2.3.9. Dondurma ve Çözme Yöntemi

Bu yöntem ile dondurulmuş ve çözündürülmüş MLV'ler üretilebilmektedir. Dondurulmuş ve çözülmüş MLV'ler, TFH yöntemi ile hazırlanan 8 mL niozomal süspansiyonların sıvı nitrojende 60 saniye boyunca dondurulması ve 60°C'de bir su banyosunda eritilmesi sonucunda üretilmiştir (Abdelkader ve ark., 2011). Oluşan yapıda ince tabakalar arasındaki iç içe veziküller yaygın olarak görülmektedir (Hope ve ark., 1986). MLV preparatlarının dondurulması ve çözülmesi tutulan hacmi ve denge çözünen madde dağılımlarını arttırmak için uygun bir prosedür sunmaktadır. Bu tekniğin, potansiyel olarak toksik çözücü maddelerin kullanımını gerektirmediği gerçeği, önemli bir ek fayda sağlamaktadır (Mayer ve ark., 1985; Hope ve ark., 1986). Naltrekson hidroklorür niozomları dondurma ve çözme yöntemine göre hazırlanmıştır (Abdelkader ve ark., 2011).

2.2.3.10. Dehidrasyon Rehidrasyon Yöntemi (DRM)

Dehidrasyon rehidrasyon yöntemi Kirby ve Gregoriadis tarafından 1984 yılında tanımlanmıştır (Uchegbu ve Vyas, 1998). Bu yöntem farmakolojik uygulamalar için özel olarak tasarlanmış yüksek tutma etkinliğine sahip MLV'leri üretmek için kullanılmaktadır. Teknik, MLV'lerin veya tek katmanlı veziküllerin, çözeltinin varlığında sulu ortamda kurutulmasını ve ardından kontrollü rehidrasyon işlemini gerektirir. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ve vakum veya konveksiyonla doğrudan kurutma yöntemleri kullanılmaktadır. Kurutma işlemi sırasında, lipit veziküller, çözücü ile birlikte konsantre edilir ve bir noktada, tutundurulacak olan maddeyi içeren büyük agregatlar oluşur. Dondurma-çözülme, dehidrasyon-rehidrasyon ve ters faz da dâhil olmak üzere çeşitli işlemlerle daha büyük tutundurulmuş hacimler ve denge çözücü dağılımları elde edilebilir. MLV sistemleri arasındaki farklar, yığın şeklinde kalan ince tabakaların oranına, sistemlerin boyutuna, lipit bileşimine ve tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Alternatif olarak, suda çözünen moleküller için dondurma çözülme ve hidrasyon teknikleri daha uygundur (Hope ve ark., 1986).

2.2.3.11. Trans Membran pH Gradyanı (Asidik) Etken Madde Yükleme İşlemi/Uzaktan Yükleme

Bu yönteme göre, niozomların iç kısmı dış kısma göre daha düşük pH değerine (asidik pH) sahiptir. Eklenen iyonize olmayan bazik ilaç niozom membranını geçmekte ancak niozom içine girdikten sonra asidik ortamda iyonlaşmaktadır. Niozomu terk edememesine bağlı olarak bu yöntem bu tür ilaçların kapsülleme verimliliğini arttırmaktadır.

Niozomların iç kısmına doğru asidik pH, ilaçlar için intraveziküler tuzak gibi davranmaktadır (Rajera ve ark., 2011; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Film oluşumundan sonra asidik bir bileşik (genel olarak sitrik asit) çözeltisi filme ilave edilir ve mekanik olarak karıştırılır. Elde edilen ürün üzerinde sulu bir ilaç solüsyonu eklenip karışım vortekslenerek donma-çözme çevrimleri gerçekleştirilir. Daha sonra pH, bir tampon çözeltisi eklenerek 7,0-7,2'ye ayarlanmaktadır. Yöntemin yüksek kapsülleme verimi avantajı, organik solvent kullanılması ise dezavantajı olarak bildirilmiştir (Baillie ve ark., 1985).

2.2.3.12. Proniozomlardan Niozomların Oluşumu

Lipozomların sulu süspansiyonlarının fiziksel kararlılığı ile ilgili problemler, nedeniyle kullanımdan hemen önce hidre edilebilen kuru ve serbest akıcı bir granül ürün olan proniozom, 1986 yılında Payne ve çalışma arkadaşları tarafından piyasaya sürülmüştür (Hu ve Rhodes, 1999). Proniozom, yeni bir ilaç taşıyıcı hazırlama yöntemidir ve niozomal taşıyıcı sistemlerin derhal hazırlanması için kararlı öncüller olarak kullanılmaktadır (Mokhtar ve ark., 2008). Proniozomlar, sorbitol gibi taşıyıcıların organik solventler içinde çözündürülmüş iyonik olmayan yüzey aktif maddelerle kaplanmasıyla oluşturulan, suda çözünebilen gözenekli kuru formülasyonlardır. Proniozomlara sıcak su ilavesi sonrasında karıştırma işlemiyle niozomlar üretilmektedir (Blazek-Welsh ve Rhodes, 2001; Hu ve Rhodes, 1999). Prolipozomlar kuru halde steril olarak depolanabilmekte ve dağılabilmektedir. Gerekğinde su ilave edilerek izotonik çok katmanlı bir lipozomal süspansiyon oluşturmak üzere çözülmetedir (Hu ve Rhodes, 1999).

Genellikle SUV'lar, sonikasyon (bir banyo veya bir sonda ile) veya yüksek basınçlı homojenleştirme (bir mikro-akışkanlaştırıcı) veya yüksek basınç altında ekstrüzyon (Fransız basınç hücresi kullanılarak) yoluyla MLV dispersiyonlarını SUV'lara dönüştürerek hazırlanır. Enerjinin uygulanması sırasında MLV yapısı bozulmakta ve yüksek kavis yarıçaplı SUV'lar oluşturulmaktadır (Uchegbu ve Vyas, 1998; Zucker ve ark., 2009; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Proniozom tekniği kullanılarak flurbiprofen (Mokhtar ve ark., 2008) ve aseklofenak (Solanki ve ark., 2008) maddeleri kapsüllenmiş ve niozomlar oluşturulmuştur.

2.2.3.13. Handjani-Vila Metodu

Sentetik iyonik olmayan lipidlerin eşdeğer miktarları, kapsüllenmek üzere etken maddenin sulu solüsyonu ile karıştırılır ve çalkalanarak homojen bir tabakalı film oluşur.

Ortaya çıkan karışım, ultrasantrifüj ve kontrollü bir sıcaklıkta çalkalamayla homojenize edilir (Şahin, 2007).

2.2.4. Kapsüllenemeyen Etkin Maddeyi Ayırma Teknikleri

Yüzey aktif maddenin hidratasyonu lipit ve ilaç yüklemesinin optimizasyonuna bağlı olmasına rağmen çekirdek maddenin tamamının kapsüllenmesi sağlanamaz. Bu nedenle sıklıkla kapsüllenemeyen ilacın çeşitli yollarla uzaklaştırılması gerekmektedir (Uchegbu ve Vyas, 1998). Kapsüllenemeyen çekirdek maddenin niozomlardan ayrılması için sıklıkla aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır.

2.2.4.1. Diyaliz

Sulu niozomal dispersiyon oda sıcaklığında uygun çözündürme ortamına (PBS, normal salin veya glikoz çözeltisi) karşı serbest moleküler ağırlık kesme (cutoff) özelliğine sahip diyaliz membran torbalarını kullanarak diyaliz edilir. Yaklaşık 12.000- 15.000 rpm ve 5-60 dakika süreyle (ilgili bileşenlere bağlı olarak) dönme hızı ile santrifüje tabi tutularak serbest ilaçlar ayrılır. Numuneler ortamdan uygun zaman aralıklarında geri çekilir, santrifüj uygulanır ve ilaç içeriği için uygun yöntem (UV spektroskopi, HPLC vb.) kullanılarak analiz edilir (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Kapsamlı diyaliz yöntemi ucuz bir yöntem olmakla birlikte 10 µm'den daha büyük veziküller ve oldukça viskoz sistemler için uygundur. Uygulamanın 5-24 saat süren oldukça yavaş bir işlem olması, büyük hacimlerde diyalizat gerektirmesi, işlem sırasında veziküllerin seyrilmesiyle ve bir ultrafiltrasyon hücresi gibi başka bir konsantrasyon aşamasına ihtiyaç duyulması uygulamanın dezavantajlarıdır (Uchegbu, 2005; Uchegbu ve Vyas, 1998). Ketorolak tromethamin (Devaraj ve ark., 2002), metotreksat (Azmin ve ark., 1985), siprofloksasin (Moazeni ve ark., 2010) ve sodyum stiboglukonat (Hunter ve ark., 1988; Baillie ve ark., 1986) niozomlarının hazırlanmasında serbest etken madde diyaliz yöntemiyle kapsüllerden ayrılmıştır.

2.2.4.2. Jel Filtrasyon

Kapsüllenemeyen maddeler bir Sephadex-G-50 kolonu vasıtasıyla niozomal dağılımın jel filtrasyonu ile uzaklaştırılır ve hareketli faz olarak fosfat tamponlu, salin veya normal tuzlu su ile yıkanarak uygun analitik teknikler ile analiz edilir (Yoshioka ve ark., 1994). Veziküllerin saflaştırılması için kullanılan jel filtrasyonu yöntemi, geleneksel diyaliz yöntemlerinden biraz daha hızlıdır. Numune en az iki kat seyreltilmesine rağmen ayırma işlemi en az 5 dakika içinde gerçekleşir. Düşük molekül ağırlıklı (C₁₂) yüzey aktif madde

monomerlerinden hazırlanan veziküllerin istikrarsızlaşmasını önleyebilir. Sephadex G50 ile 4-5 dakikada hızlı bir şekilde küçük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayrılması için uygundur. Bu yöntemde, jellerin tekrar kullanımı sağlanmadığında yöntemin pahalı olması, niozomların seyreltilmesi, yüksek viskoziteli ve 10-20 µm'den büyük parçacık boyutlu formülasyonlar için uygun olmaması yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır. Makro moleküllerin ayrımı için Sepharose 2B veya 4B kullanımı 1-2 saat sürmesi de yöntemin dezavantajları arasında gösterilmektedir (Uchegbu, 2005; Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu ve Vyas, 1998). 5(6)-karboksi fluorescein (Yoshioka ve ark., 1994) ve karboksifluorescein (van Hal ve ark., 1996; Yoshida ve ark., 1992) niozomlarından serbest çekirdek maddenin uzaklaştırılması için jel filtrasyon yöntemi kullanılmıştır.

2.2.4.3. Santrifüjleme

Bu teknikte niozomal süspansiyondan kapsüllenemeyen maddeler santrifüj (<7000 x g) yardımıyla ayrılır. Supernatant kısım alınır ve pellet kısım yıkanır. Kapsüllenemeyen çekirdek maddeden arındırılmış bir niozomal süspansiyon elde etmek için yeniden süspansiyon edilir (Diljot, 2012; Hu ve Rhodes, 1999). Alt mikron boyutlu veziküller daha yüksek santrifüj hızları (~150.000 x g) gerektirirken, yaklaşık 1µm boyutunda büyük niozomlar (Kerr ve ark., 1988; Rogerson ve ark., 1988) için 1 saat boyunca 7000 x g'de santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj ile ayırma işlemi niozomal dağılımı konsantre eden, ucuz ve hızlı (~30 dakika) bir uygulamadır. Santrifüj edilen sistemin kırılkan yapıda olması durumunda zarar görmesi ve mikrometreden daha küçük niozomların çöktürülememesi sistemin dezavantajları olarak bildirilmiştir (Uchegbu ve Vyas, 1998). İbuprofen (Hu ve Rhodes, 1999), flurbiprofen (Mokhtar ve ark., 2008), latanoprost (Aswathy ve John, 2014), andrografolid (Tu ve ark., 2014) ve doksorubisin (Rogerson ve ark., 1988) niozomlarının serbest etken maddeden ayrılması için santrifüj tekniği kullanılmıştır.

2.2.4.4. Ultra Santrifüj

Niozomal solüsyonda pellet kısmın tutundurulamamış çekirdek maddeden ayrılması için kullanılan yöntemlerden biride ultrasantrifüj uygulamasıdır. Niozomların oluşturulması (~150.000 x g) sonrası serbest çekirdek madde pellet kısımdan tamamen uzaklaştırılır. Su veya fosfat tamponu ile yıkanır ve seyreltilir. Bu yöntem ile neredeyse tüm veziküller çöktürülmekte ve niozom dağılımı konsantre edilmektedir. Ultrasantrifüj uygulamalarının 1-1,5 saat sürmesi, kullanılan cihazların pahalı olması, agregasyona neden olabilmesi ve santrifüj edilecek sistemin kırılkan bir yapıda olması durumunda zarar görmesi yöntemin

dezavantajları olarak gösterilmiştir (Uchegbu ve Vyas, 1998). α - tokoferol (Basiri ve ark., 2017) nistatin (Desai ve ark., 2011) ve 5(6)-karboksifluorescein (Arunothayanun ve ark., 2000) niozomlarından serbest çekirdek maddenin uzaklaştırılmasında ultrasantrifüj tekniği kullanılmıştır.

2.2.5. Niozom Boyutlarını Küçültme Teknikleri

Vezikül oluşumu, hafifçe karıştırma veya prob sonikasyonu şeklinde bir enerji girişi gerektirir. Genellikle, yüzey aktif madde/lipit karışımları, kapsüllenecek materyalin varlığında, yüzey aktif maddenin jel/sıvı geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta sulu bir çözelti içerisinde hidratlanır. Vezikül büyüklüğü aktif maddenin biyolojik dağılımının önemli bir belirleyicisidir. Hidratasyon adımından sonra niozom üretim prosedürüne genellikle bir boyut küçültme basamağı dahil edilmelidir (Uchegbu ve Vyas, 1998). Prob sonikasyonu, belirli gözenek çapındaki filtreler ile ekstrüzyon, sonikasyon ve filtreleme kombinasyonları, mikro akışkanlaştırma ve yüksek basınçlı homejenizasyon gibi yöntemler vezikül boyutlarının küçültülmesi için kullanılmaktadır (Şahin, 2007; Abdelkader ve ark., 2013).

Prob sonikasyonu: 100-140 nm arasında niozomal vezikül boyutları üretilmektedir (Azmin ve ark., 1985; Baillie ve ark., 1985). Ultrasonik banyo uygulamasından daha etkili olmasına rağmen prob sonikasyonu ile daha yüksek bir enerji girdisi sağlanmakta ve çözeltinin sıcaklığını keskin bir şekilde arttırmaktadır. Ayrıca titanyum parçalarının sonike edilen dispersiyona dökülmesine neden olmaktadır. Bu metalik parçaların niozomal dispersiyondan ayrılması için ek bir santrifüj işlemi gerekmektedir (Abdelkader ve ark., 2013).

Filtreler aracılığı ile ekstrüzyon: DPTA niozomları hidratasyon sonrası sonike ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ekstrüzyon ünitesi (Milipore C) ile 1-0,22 μ m aralığında polikarbonat membranlar (Nucleopore) kullanılarak ekstrüde edilmiştir (Uchegbu, 2005).

Sonikasyon ve filtreleme kombinasyonu: 200 nm boyut aralığında span 60 ile hazırlanan doksorubisin niozomlarının üretimi için sonikasyon ve filtrasyon kombinasyonu (220 nm Millipore® Filtre) kullanılmıştır (Uchegbu ve Vyas, 1998).

Mikroakışkanlaştırma: 50 nm'nin altındaki boyutlarda niozomların üretimi (Uchegbu ve Vyas, 1998).

Yüksek basınçlı homejenizasyon: Çapı 100 nm'nin altında veziküller üretilmiş, ancak küçük boyutlu veziküllerin eldesi sırasında kapsüllenen ilaç hacmi azalmıştır (Uchegbu ve

Vyas, 1998).

Boyut küçültme veziküllerin enkapsülasyon verimini olumsuz şekilde etkilemektedir. Bu, veziküllerin iç hacimlerinin küçük olmasına ve küçük ve orta büyüklükte tek katmanlı veziküllerden (100 nm'ye kadar) ilaç sızıntılarına bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir (Zhigaltsev ve ark., 2001; Abdelkader ve ark., 2013). Küçük orijinal veziküler boyuta sahip niozom formülasyonlarının düşük kararlılığı termodinamik teoriye göre tanımlanmıştır, çünkü daha küçük niozomlar daha fazla yüzey serbest enerjisi içerir ve aşırı serbest enerjiyi azaltmak için daha fazla toplanma eğilimindedir. Buna bağlı olarak küçük boyuttaki niozomlar büyüklerle karşılaştırıldığında stabiliteyi daha düşüktür (Moazeni ve ark., 2010).

2.2.6. Niozom Oluşumunu Etkileyen Faktörler

2.2.6.1. Yüzey Aktif Maddelerin Türü

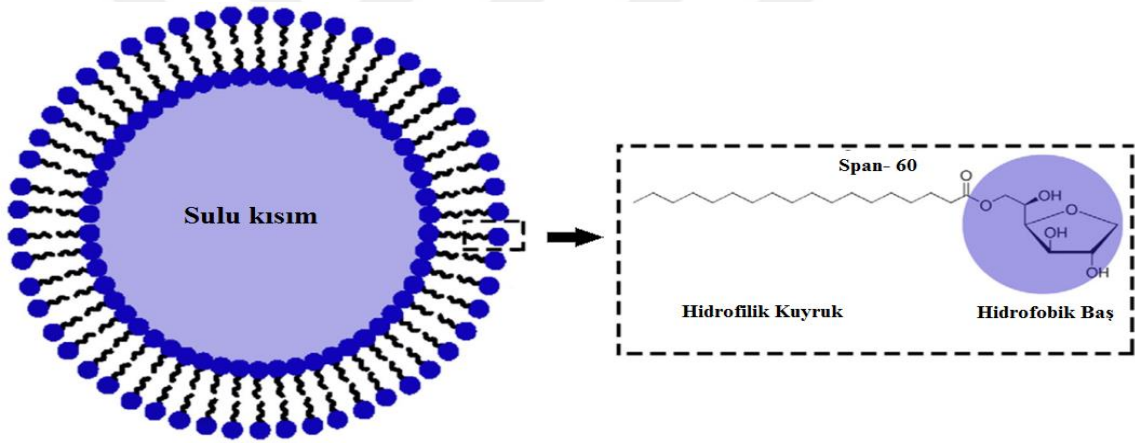
Kimyasal bileşiklerin eşsiz bir sınıfını oluşturan yüzey aktif maddeler farklı çözünürlüklere, hidrofilik bir uça ve hidrofobik olan lipofilik bir uça sahip iki farklı bölgeye amfifilik [biyolojik hücre zarlarının temelini oluşturan fosfolipitler (fosfatidilkolin)] molekülleridir. Lipofilik bölge, alkanlar, florokarbonlar, aromatik veya diğer kutupsuz gruplardan oluşan zincirlerdir. Baş grubu ise, sülfonatlar, karboksilatlar, fosfonatlar ve amonyum türevleri gibi aşırı çözünmüş hidrofilik işlevsellikleri içerir. Yüzey aktif maddeler anyonik, katyonik, amfoterik ve iyonik olmayan olarak sınıflandırılmaktadır (Steed ve ark., 2008).

Niozomların hazırlanmasında kullanılan yüzey aktif maddelerin tipi niozomların enkapsülasyon verimini, toksisitesini ve stabilitesini etkilemektedir. Çift alkil zincirlerine sahip doğal olarak oluşan fosfolipitlerin (asıl lipoform oluşturan lipidlerin) aksine, en çok kullanılan niozome oluşturan amfifiller, tek zincirli, sentetik, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerdir (Uchegbu ve Florence, 1995; Abdelkader ve ark., 2013). İlk olarak niozomlar kolesterol ve alkil oksietilen gibi tek zincirli yüzey aktif maddeler kullanılarak formüle edilmiştir. Alkil grubu zincir uzunluğu genellikle C₁₂-C₁₈'dir (Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu ve Vyas, 1998; Şahin, 2007).

İyonik olmayan yüzey aktif maddeler, kontrollü, hedefe yönelik ve sürekli ilaç dağıtımında geniş bir rolü olan oldukça iyi polimerik nanokarbonlardır. Genellikle yüzey aktif maddeler kutup başı gruplarına göre sınıflandırılır. İyonik olmayan bir sürfaktanın başında yük grupları yoktur. İyonik yüzey aktif maddenin başında bir net yük vardır ve anyonik yüzey aktif madde olarak isimlendirilir. Bu sürfaktanların örnekleri arasında yağlı asit tuzları (sabunlar), sülfatlar, eter sülfatlar ve fosfat esterler bulunmaktadır. Baş yükü

pozitifse, katyonik sürfaktan denilmektedir. Bir yüzey aktif cismi, iki zıt yüklü grup içeren bir kafa içeriyorsa, zwitteriyonik (amfoterik) bir yüzey aktif cismi olarak adlandırılır. Katyonik yüzey aktif maddeler de genellikle tahriş edici ve bazen zehirlidir. Bu nedenle ilaç dağıtımındaki uygulamaları, diğer üç sınıfa ait sınıfa göre daha sınırlıdır (Steed ve ark., 2008; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

İyonik olmayan yüzey aktif maddeler, hidrofilik başlıklarında yük gruplarına sahip olmayan bir yüzey aktif madde kategorisidir. Bu nedenle, çözeltilerde iyonik olmayan yüzey aktif maddeler, hidrofilik başların sulu çözeltilerin tarafında ve hidrofilik kuyrukların organik çözeltilerin tarafında olduğu yapılar oluşturabilir. Sulu ortamda yüzey aktif maddelerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşan niozomlarda kullanılan iyonik olmayan amfifiller dört kategoride sınıflandırılır: Alkil esterler, alkil amidler, alkil eterler ve yağ asitlerinin esterleri (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011).



Şekil 2.5. Sorbitan monostearat (Span 60) tarafından hazırlanan niozomun şematik gösterimi (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)

Niozomları oluşturmak için eterik yüzey aktif maddeler de kullanılmıştır. Bu sürfaktan türleri tek zincirli, monoalkil veya dialkil zincirden oluşur. En sonuncusu fosfolipitlere benzemekte ve daha yüksek kapsülleme verimi sağlamaktadır. Ester tipi amfifil yüzey aktif maddeleri de niozom formülasyonu için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hem alkil eterler hem de alkil esterler, ticari olarak bulunabilirliği ve düşük toksisitesi nedeniyle, niozom ilaç dağıtım taşıyıcıları olarak daha geniş bir uygulama alanına sahiptir (Abdelkader ve ark., 2013; Uchegbu ve Florence, 1995). Esterazlar, trigliseridler ve yağlı asitler tarafından bozunurlar. Bu tür yüzey aktif maddeler eter tiplerine göre daha kararlı olmakla birlikte, daha az toksisiteye sahiptirler. Ayrıca, miristil, setil ve stearil alkollerin glukozitleri de

niozom oluştururlar (şahin, 2007).

Niozomların oluşturulmasında yüzey aktif madde seçimi, hidrofilik-lipofilik denge, kritik ambalaj parametresi ve yüzey aktif maddenin jel sıvı geçiş sıcaklığına bağlıdır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

2.2.6.2.1.Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB)

HLB herhangi bir sürfaktanın vezikül oluşturma yeteneğinin iyi bir göstergesidir. Yüzey aktif maddenin HLB değeri, enkapsülasyon veriminin kontrolünde önemli parametrelerden biridir (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011).

HLB değeri iyonik olmayan yüzey aktif maddeler için 0-20 arasındadır. HLB değeri 9'dan daha küçük olan yüzey aktif maddeler hidrofilik (suda çözünür) olarak, 11'den büyük olanlar lipofilik (yağda çözünür) olarak adlandırılmaktadır. HLB sayısı 3 ile 8 arasında olan yüzey aktif maddeler, iki katmanlı yüzeylerin hazırlanması için uygun olduğu bildirilmiştir ve yağ içinde su emülsiyonunu (W/O) belirtmektedir. Ayrıca, su içinde yağ (O/W) emülsiyonları, HLB değerleri 8-18 aralığında olan yüzey aktif maddeler ile hazırlanmaktadır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014; şahin, 2007).

Literatürde, hidratasyon sırasında suda çözünürlük nedeniyle hidrofilik yüzey aktif maddelerin serbest sulu veziküller oluşturamayacakları, daha ziyade bu serbest birimlerin katılaşarak tabakalı yapılar oluşturmak üzere birleştiği bildirilmiştir (Girigoswami ve ark., 2006). Bu nedenle niozomlar genellikle HLB 14-17 arasında oluşmazlar. Tween sürfaktanlarının HLB değerleri, Span yüzey aktif maddelerine göre daha yüksektir ve bu nedenle niozom oluşturamayabilir. Span sürfaktanlarının HLB değerlerinin çok daha düşük olması nedeniyle niozomlar oluşmaktadır. Ancak Tween 80 için birkaç veziküler ünite oluşur (Israelachvili, 2011).

HLB değeri 4 ile 8 arasında olan sorbitan monostearat (Span) yüzey aktif maddelerinin vezikül oluşumu ile uyumlu olduklarını bildirilmiştir (Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu ve Vyas, 1998).

HLB değerinin niozom oluşumuna etkisi, potansiyel bir niozom sisteminde CPP'nin hidrofobik grupların varlığını göz önüne alması gerektiğini ortaya koymaktadır (Israelachvili, 2011).

2.2.6.2.2. Kritik Ambalaj Parametresi (CPP)

HLB değerine ilaveten, yüzey aktif maddenin vezikül oluşturabilme kabiliyetinin tahmini için kimyasal yapı ve çeşitli diğer faktörler önemli rol oynamaktadır.

$$CCP = v/l_c \cdot a_0 \quad (2.1)$$

v =Hidrofobik grup hacmi

l_c =Kritik hidrofobik grup uzunluğu

a_0 =Hidrofil baş grubunun alanı

Vezikül türü, kullanılan yüzey aktif maddenin boyutsuz bir ölçeği olan CPP değerine bağlı olarak tahmin edilmektedir. CPP, yüzey aktif maddelerin küresel miselleri ($CPP < 1/3$), küresel olmayan miselleri ($1/3 < CPP < 1/2$), çift katmanlı vezikülleri ($1/2 < CPP < 1$) veya tersine miselleri ($CPP \geq 1$) oluşturma kabiliyetini göstermektedir (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014; Pardakhty ve ark., 2007).

2.2.6.2.3. Jel Sıvı Geçiş Sıcaklığı (T_c)

Yüzey aktif maddenin faz geçiş sıcaklığı enkapsülasyon verimi üzerinde doğrudan etkili olan parametrelerden biridir. Yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip yüzey aktif maddelerin bir örneği olan Span 60, en yüksek enkapsülasyon verimi sağlamaktadır (Kumar ve Rajeshwarrao, 2011; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

Yüzey aktif madde seçimi çift katmanlı zarın akışkanlığını belirlemektedir. Jel-sıvı geçiş sıcaklığı ne kadar yüksek ise, niozomların aktif maddeyi tutucu özellikleri o kadar yüksektir. Bunun nedeni, çift katmanlı zarların depolama koşullarında daima jel durumunda olmasıdır (Abdelkader ve ark., 2013).

2.2.6.2. Yüzey Aktif Madde/Lipit ve Yüzey Aktif/Su Oranları

Diğer önemli parametreler, yüzey aktif madde/lipit ve yüzey aktif madde/su oranının belirlenmesidir. Yüzey aktif madde/lipit oranı genellikle 10-30 mM (%1-2,5 w/w) 'dır. Bu oran çok yüksekse, yüzey aktif madde/ lipit seviyesinin artırılması kapsüllenmiş toplam ilaç miktarını arttırmaktadır. Hidratasyon işlemi sırasında yüzey aktif madde/su oranındaki değişim, sistemin mikro yapısını ve dolayısıyla sistemin özelliklerini etkileyebilmektedir (Şahin, 2007).

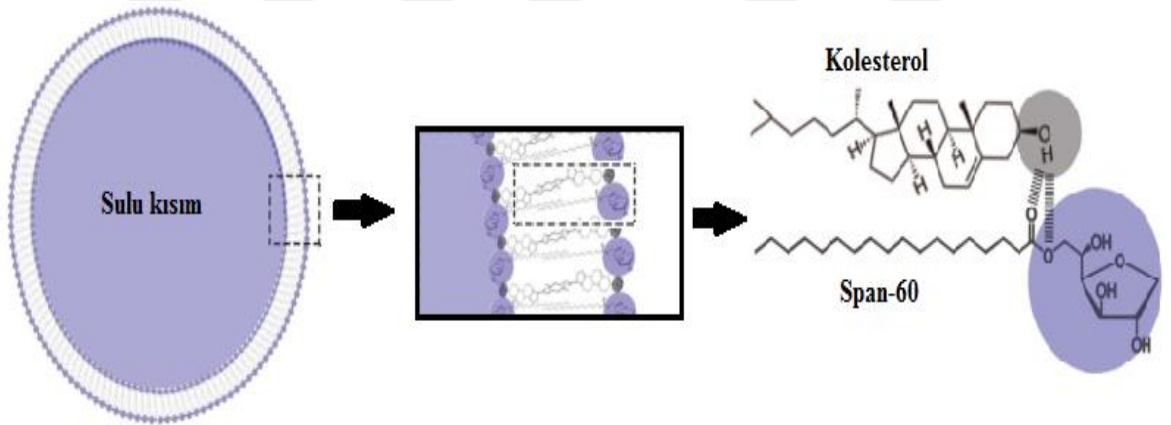
2.2.6.3. Kolesterol ve Diğer Katkı Maddeleri

Niozomların hazırlanmasında en yaygın kullanılan katkı maddelerinden biri doğal bir steroid olan kolesteroldür. Kolesterol lipit olarak kabul edilir, ancak nispeten katı bir molekül olup, açıl zincirli bir lipitin barınma kabiliyetinden yoksundur (Abdelkader ve ark.,

2013). Özellikle, kolesterol kendi başına çift katmanlı yapılar oluşturmamaktadır (Israelachvili ve ark., 1980).

Vezikülün çift katmanındaki kolesterolün konumu ve bir yüzey aktif maddenin hidrofilik başı (Span 60) ile hidrojen bağı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Moleküler şekil ve çözünürlük özelliklerinden dolayı, kolesterol amfifiller arasındaki boşlukları doldurmakta ve böylece çift katmanlı yapıyı daha güçlü bir hale getirmektedir. Genel olarak, kolesterolün eklenmesi, membran stabilitesi, geçirgenlik ve akışkanlık, sertlik, kapsülleme verimi, dondurularak kurutulmuş niozomların yeniden hidrasyon kolaylığı ve toksisitesi gibi özellikleri etkilemektedir (Uchegbu ve Florence, 1995; Uchegbu ve Vyas, 1998; van Hal ve ark., 1996; Şahin, 2007; McMullen ve McElhaney, 1996; Sankaram ve Thompson, 1990). Formülasyonlarda, jelden sıvı faza geçişe neden olan itici sterik veya elektrostatik etkilerle agregat oluşumuna karşı sistemi stabilize eden moleküller eklenir. Bu moleküller vezikül agregasyonunu önlemek için çoğunlukla 1:1 M oranda kullanılmakta ve niozomlar daha az sızdırır hale gelmektedir (Şahin, 2007). Balakrishnan ve ark. (2009) tarafından hazırlanan minoxidil niozomlarında maksimum enkapsülasyon verimi span 60 ve kolesterolün 1:1 M oranda kullanımında sağlanmıştır.



Şekil 2.6. Span 60 ve kolesterolün niozomal yapıdaki şematik gösterimi (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014)

HLB değeri 6'dan büyük olan Tween 20 ve Tween 61 gibi bazı suda çözünür yüzey aktif maddeler normal koşullar altında veziküller oluşturamazlar. Bu yüzey aktif maddeler, liyolesitine özdeş bir şekilde miseller oluşturmayı tercih etmektedir (Abdelkader ve ark., 2013; Manosroi ve ark., 2003; Kumar ve Rajeshwarrao, 2011). Bu yüzey aktif maddeler, kolesterol ile karıştırıldığında veziküller oluşturabilir ve kolesterolmolekülleri ile iki katmanlı vezikülleri oluşturmak için birlikte çalışırlar.

Marwa, (2015) tarafından yapılan çalışmada diklofenak sodyum niozomlarının maksimum kapsülleme verimi ($38,05 \pm 0,56$) span 60 ve kolesterolün 1:1 M oranda kullanımında belirlenmiştir. Kullanılan kolestreol konsantrasyonu arttıkça ilaç salınımının azaldığı gözlemlenmiştir.

Niozomların stabilize edilmesinde kullanılan yöntemlerden biri de, çift katmana yüklü bir molekül eklenmesine dayanmaktadır. Disetil fosfat ve fosfatidik asit negatif yüklü moleküller olarak bilinirken, stearylamin ve setilpiridinyum klorür hem niozomların agregasyonunu önlemek için yaygın olarak kullanılan pozitif yüklü moleküllerdir (Uchegbu, 1998). Yaygın katkı maddelerinden biri olan disetil fosfat, çift katmanları stabilize etmek için niozomların yüzeyinde negatif bir yük oluşturmak veya kapsüllenmiş hemoglobinlerde olduğu gibi eritrositlere benzer bir elektroforetik mobiliteye ulaşmak için kullanılmaktadır (Waddad ve ark., 2013). Yüklü molekül niozomal formülasyona %2,5-5 mol oranında eklenmektedir. Yüklü moleküllerin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanımı niozom oluşumunu inhibe edebilmektedir (Hu ve Rhodes, 1999; Junyaprasert ve ark., 2008).

2.2.7. Niozomların Karakterizasyonu

Niozomlar, çok yönlü ilaç dağıtım sistemleridir. Dolayısıyla, bu çok yönlülük, amaçlanan uygulama yoluna uyacak şekilde uygun fizikokimyasal karakterizasyon tekniklerini gerekli kılmaktadır (Abdelkader ve ark., 2013). Niozomların fizikokimyasal karakterizasyonu vezikül büyüklüğü ve morfolojisi, boyut dağılımı, yük ve zeta potansiyeli, enkapsülasyon verimi, ilaç salınım eğrisi, katmanlılık, rijidite, stabilite, viskozite, iletkenlik ve homojenlik gibi analizleri içermektedir (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

2.2.7.1. Niozomların Ortalama Vezikül Büyüklüğü, Morfolojisi ve Boyut Dağılımı

Nanoparçacıkların karakterizasyonları öncelikle partikül boyutu, dağılımı ve morfolojisi ile değerlendirilir. Elektron mikroskobu kullanımıyla veziküllerin morfolojisi ve büyüklüğünü tespit etmek mümkündür (Bhatia, 2016). Niozomlar küresel şekiller olarak kabul edilir ve büyüklükleri aşağıdaki teknikler kullanılarak belirlenmektedir.

- 1) Işık Mikroskopisi (Attia ve ark., 2007)
- 2) Coulter Sayacı (çapı 1 μm 'nin üzerinde olan parçacıklar için),
- 3) Foton Korelasyon Spektroskopisi (Arunothayanun ve ark., 2000),
- 4) Elektron Mikroskobu Analizi [Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Aswathy ve John, 2014), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) (Desai ve ark., 2011), Dondurarak Kırma Replikasyonu-Elektron Mikroskobu (FF-TEM)],

5) Işıık Saçma Teknikleri [Spektrometre-Dinamik Işıık Saçılması (DLS) cihazı (Basiri ve ark., 2017)],

6) Zetasizer (Alam ve ark., 2009) ve Mastersizer (Aggarwal ve ark., 2004).

Ayrıca, niozom boyut dağılımı ve polidispersite indeksi (PDL), dinamik ışık saçan tanecik boyutu analizcisi kullanılarak ölçülebilir. Vesikül boyutu yaklaşık 20 nm ile yaklaşık 50 µm arasında olabilmektedir (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

2.2.7.2. Enkapsülasyon Verimi (%EE)

Niozomların enkapsülasyon verimi, dispersiyonun stabilitesine, vezikül yükünü yöneten yöntem ve faktörlere ve veziküllerin içsel özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Beklendiği gibi, daha büyük niozomlar ve fosfolipit veziküller, kural olarak, küçük veziküllerden daha yüksek enkapsülasyon verimi göstermektedir. Vezikülün devam eden bütünlüğü, enkapsülasyon verimliliği üzerinde direkt bir dayanağa sahip olduğu için, niozomların membran stabilitesi önemlidir. Stabil membranların intraveziküler çözünürlüğü kaybetme olasılığı daha düşüktür ve dolayısıyla daha yüksek çözünen seviyelerini muhafaza edebilir (Uchegbu ve Florence, 1995).

Niozom veziküllerinin hazırlanmasından sonra kapsüllenemeyen çekirdek madde diyaliz, jel kromatografisi, santrifüjleme, veya filtrasyon uygulamalarıyla kapsüllerden uzaklaştırılmaktadır (Verma ve ark., 2010). Kapsüllenen ilaç miktarının belirlenebilmesinde, çeşitli kimyasallar kullanılarak pellet kısım parçalanmakta ve kapsüllenen ilaç açığa çıkarılmaktadır. Supernatant kısmın uzaklaştırıldığı pellete %50 n-propanol (Pardakhty ve ark., 2011), %0,1 Triton X-100 (Jatav ve ark., 2011) veya metanol (El-Ridy ve ark., 2012) ilave edilerek niozomlar parçalanmakta ve kapsüllenen ilaç parçalanmış pelletlerden uzaklaştırılmaktadır. Parçalanmış kapsüller ile sıvı faz ayrımı sonrasında, sıvı faza geçen ilaç miktarı HPLC (Karki ve ark., 2008) ve spektrofotometre (Ruckmani ve Sankar, 2010) gibi analiz yöntemleriyle belirlenebilmekte ve niozomlar tarafından kapsüllenen aktif bileşenin yüzdesel miktarı enkapsülasyon verimi olarak tanımlanmaktadır.

Süpernatant kısımdaki serbest ilaç miktarının belirlenmesinde ise kullanılacak olan yöntemle ilgili olarak seyreltmeler uygulanır ve serbest ilaç miktarı uygun yöntemler (HPLC, Spektrofotometre) ile belirlenmektedir (Uchegbu ve Vyas, 1998; Kiwada ve ark., 1985).

Niozomların enkapsülasyon verimi hazırlama yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Eter enjeksiyon yöntemi ile hazırlanan niozomlar, film hidrasyon yöntemi veya sonikasyon yöntemi ile hazırlananlardan daha yüksek enkapsülasyon verimine sahiptir. Tekli veya

dialkil zincirli iyonik olmayan yüzey aktif maddelere kolesterol ilavesi enkapsülasyon verimini önemli ölçüde değiştirmektedir. Bununla birlikte, gliserol tipi yüzey aktif maddeler, kolesterol miktarı arttıkça kapsülleme veriminde azalmaya neden olmaktadır (Şahin, 2007). Chandraprakash et al.(1990) Span 40, Span 60 ve Span 80 gibi lipofilik yüzey aktif maddeleri kullanarak methotrexate yüklü niozomlar hazırlamışlardır. En yüksek enkapsülasyon verimi Span 60'ın (HLB 4,7) kullanıldığı kapsüllerde, en düşük enkapsülasyon verimi ise Span 85'in (HLB 9,8) kullanıldığı kapsüllerde belirlenmiştir.

2.2.7.3. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli, koloidal sistemlerdeki elektrokinetik potansiyel için bilimsel bir terimdir (Mills ve ark., 1993). Koloidal kimya literatüründe, zeta potansiyeli, dağıtma ortamıyla dağılık parçacığa tutturulmuş sabit sıvı tabakası arasındaki potansiyel farktır (Silva ve ark., 2012). Düşük yüklü yüzeyleri aşırı yüklü yüzeylerden ayıran keyfi değer olarak 30 mV'luk bir değer (pozitif veya negatif) alınmaktadır (Preetz ve ark., 2010). Genellikle, 30 mV'nin üzerindeki (Pozitif veya negatif) zeta-potansiyel değerleri, daha kararlı dispersiyonlara neden olmaktadır çünkü parçacıklar arasındaki itme agregasyonu engellemektedir (Jacobs ve ark., 2000). Yeterince küçük olan moleküller ve parçacıklar için, yüksek bir zeta potansiyeli stabilite sağlayacaktır; diğer bir deyişle, çözelti veya dispersiyon toplanmaya direnecektir. Potansiyel düşük olduğunda çekicilik iticiliği geçer, dağılım bozulur ve topaklaşır. Böylece, yüksek zeta potansiyeline (negatif veya pozitif) sahip kolloidler elektriksel olarak stabilize edilirken, düşük zeta potansiyeli olan kolloidler pıhtılaşmaya veya topaklaşmaya eğilimlidir (Silva ve ark., 2012). Nano ölçekli parçacıkların zeta potansiyeli, parçacıkların kaynağı ve farklı yüzey aktif maddelerle işleme, elektrolit konsantrasyonu (iyonik kuvvet), parçacık morfolojisi ve boyutu, çözeltinin pH'sı ve hidrasyonun durumu gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Simunkova ve ark., 2009).

Sezgin ve Yüksel (2010) tarafından yapılan çalışmada farklı yüzey aktif maddeler kullanılarak hazırlanan paclitaxel yüklü niozomların zeta potansiyelleri Zetasizer ile PALS (faz analizi ışık saçılması) kullanılarak ölçülmüştür. Zeta potansiyelleri -41,7 mV ve -58,4 mV aralığında belirlenmiş ve bu değerlerin elektrostatik stabilite için yeterince yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.2.7.4. Vezikül Stabilitesi

Vezikül stabilitesi oldukça karmaşık bir konudur ve veziküllerin kimyasal stabilitesi, fiziksel stabilitesi ve biyolojik stabilitesi birbiriyle ilişkilidir. Bu parametrelerin

değerlendirilmesi, nanotıpta potansiyel *in vitro/in vivo* uygulamaların belirlenmesin yönünden temel önemdedir. Bununla birlikte, biyolojik stabilite, çeşitli maddelerin eklendikten sonra veziküler yapı ile etkileşime girip girmemesine bağlıdır ve bu nedenle de uygulamaya göre değişmektedir. Stabilite genellikle, büyüklük ve zeta potansiyel, varyasyonları vasıtasıyla veya biyolojik sıvıların yokluğunda veya varlığında zaman ve/veya sıcaklığın bir fonksiyonu olarak farklı problemlerin salınım oranının değerlendirilmesi vasıtasıyla belirlenmektedir (Marianecci ve ark., 2014).

2.3. Zeytin Yaprığı Ekstraktı

Akdeniz bölgesinde zeytin yetiştiriciliği eski çağlara dek uzanmaktadır. Tarihi kayıtlar zeytin ağacının M.Ö. 3500 yıllarında Girit'te yetiştirildiğini göstermektedir. Bu uzun ömürlü ağaç, bu bölge sakinlerinin ekonomi ve kültürünün ayrılmaz bir parçasını oluşturur ve ayrıca kırsal peyzajını belirlemiştir (Loumou ve Giourga, 2003; Soni ve ark., 2006).

Medeniyet tarihi boyunca, zeytin bitkisi beslenme ve tıbbın önemli bir kaynağı olmuştur. Zeytin meyvesi, yağları ve zeytin ağacının yaprakları (Şekil 2.7) sayısız tıbbi ve diğer kullanım alanlarına sahiptir (Soni ve ark., 2006). ZYE'nin ateş ve sıtma tedavisinde kullanımı ve etkili olduğunun bildirildiği tıbbi kullanım açısından ilk resmi rapor 1854 yılında yayınlanmıştır (Lee-Huang ve ark., 2003). Öğütülmüş yapraklardan içecek yapılarak ateşin düşürülmesi için kullanılmış ilerleyen yıllarda sıtma tedavisi için çay yapımında zeytin yaprakları kullanılmıştır (Benavente-García ve ark., 2000).



Şekil 2.7. Zeytin yaprağının yapısı (*Olea europaea*) (Debib ve Boukhatem, 2017)

Zeytin ürünleri zengin fenolik bileşen içeriğinden dolayı Akdeniz diyetinin önemli bir parçasıdır (Taamalli ve ark., 2012). Fenolik bileşikler veya polifenoller, geniş bir dağılıma sahip olan, en az 8000 farklı bilinen yapıdan oluşan bitkilerde ortaya çıkan en önemli bileşik gruplarından biridir. En yaygın ve önemli düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşikler arasında basit fenolik türevler ve flavonoidler bulunmaktadır (Bravo, 2009). Fenolik maddeler birçok bitkide ortaktır ve çeşitli oksitleyici ve potansiyel olarak zararlı serbest radikallerin yol açtığı çevresel strese bir savunma olarak gelişmiştir (Visioli ve ark., 1998).

Doğal antioksidanlar arasında zeytin ağacı yağı, meyvesi ve yaprakları ile en yüksek antioksidan aktivitesi olan türlerden biri olarak kabul görmüştür. Tıp ve gıda endüstrisinde ZYE'nin, oksidatif bozunmaları içeriğindeki bazı önemli antioksidan ve fenolik bileşiklerin etkinliğiyle önlediği yapılan çalışmalar ile bulunmuştur (Jemai ve ark., 2009).

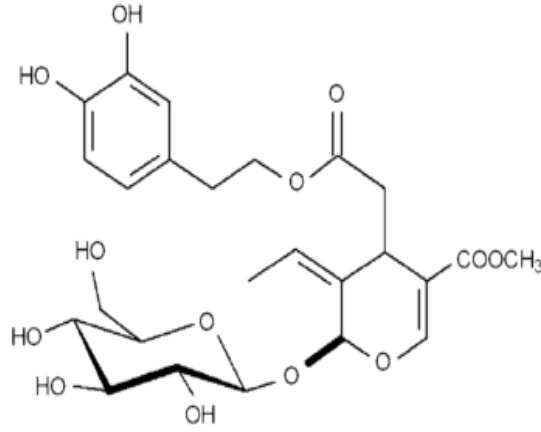
Oleuropeitler (Oleuropein), flavonlar, flavonoller ve süstitüe fenoller (tirosol, hidroksitirosol) ZYE'de bulunan bazı fenolik bileşiklerdir (Benavente-García ve ark., 2000). Zeytin bitkisinin yapraklarında en çok bulunan fenolik madde oleuropeindir (<264 mg tirosol/g kuru ağırlık) (de Bock ve ark., 2013).

Oleuropein (Şekil 2.8), 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilmiştir. Elenolik asit ve dihidroksi-feniletanolün bir heterosidik esterinin olduğu belirtilmiştir. Oleuropein, zeytin ağacının (*Olea europaea* L.) kabuğunda, yapraklarında ve meyvelerinde ve ayrıca Oleaceae'nin bazı diğer cinslerinde bulunan fenolik bir secoiridoid glikozittir (Benavente-García ve ark., 2000). Meyvede en fazla bulunan fenolik madde olan oleuropein, meyvenin kuru ağırlığının %14'ü kadarını oluşturan koyu kahverengi, acı tada sahip bir glikozittir (Soni ve ark., 2006; Sudjana ve ark., 2009). Hidroliz üzerine, Oleuropein elenolik asit, hidroksitirosol, tirosol ve glikoz oluşturmaktadır (Waterman ve Lockwood, 2007).

ZYE geniş kapsamlı sağlık yararları ile doğal bir ilaç olarak pazarlanmaktadır. Ekstrakt zeytin biyofenollerini olarak adlandırılan ve özü çeşitli terapötik özelliklere sahip olduğu düşünülen birçok farklı bileşik içermektedir. Birçok doğal ürün gibi, coğrafi konum, bitki besleme ve çeşit gibi farklılıklardan kaynaklanan varyasyonlar ekstraktın bileşimini de etkilemektedir (Sudjana ve ark., 2009).

Zeytin bitkisinden türetilmiş fenolik bileşikler (*Olea europaea* L.), antioksidan, anti-hipertansif, anti-diyabetik anti-inflamatuar, anti-aterojenik, antikojenik ve antimikrobiyal özellikler gibi çeşitli faydalı sağlık etkilerine sahiptir (Cicerale ve ark., 2010; Ahmed ve ark., 2014). Ayrıca zeytin yaprağı yiyeceklerin yanı sıra kozmetik ve çoğunlukla nutrasötik uygulamalarda birçok yararlar sağlamak için kabul görmüştür. Ekstrakt koroner arter

hastalığı, hipertansiyon, yüksek kolesterol düzeyi, aritmi, kanser, şeker hastalığı, kilolu olma, osteoporoz, herpes, grip ve soğuk algınlığı ve bazı bakteri, mantar ve mantar enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıklara karşı oldukça yüksek bir etkinliğe sahiptir. Aynı zamanda doğal, genetiği değiştirilmiş, organizma içermeyen ve alerjen içermeyen bir üründür (Erdoğan ve Turhan, 2011). Bu özelliklerin birçoğunun oleuropeinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Visioli ve ark., 2002). ZYE şu dönemde sıvı ya da kapsül olarak alınan popüler bir nutrasötik maddedir (de Bock ve ark., 2013).



Şekil 2.8. Oleuropeinin kimyasal yapısı (Andreadou ve ark., 2006)

ZYE ve oleuropein, virüslere, retrovirüslere, bakterilere, mikoplazmalara, mayalara, mantarlara, küflere ve diğer parazitlere karşı antimikrobiyal etkinliğe sahiptir (Benavente-García ve ark., 2000; Lee-Huang ve ark., 2003; Sudjana ve ark., 2009).

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve hali hazırda tıbbi kullanımda yarı sentetik formlarda uzun süre kullanılmakta olan önemli biyokimyasal maddelerdir. Ne yazık ki, hastaların veya hücre kültürleri analizleri yapılmadan yapılan reçetelerin neden olduğu kontrolsüz antibiyotik kullanımı, bakterilerin direncini arttırmıştır. Direnç artışı ve diğer bazı sorunlar antimikrobiyal bitki ekstraktlarına artan bir ilgi doğurmuştur (Friedman, 2007). Medikal amaçlı kullanılan bitkiler geleneksel tıbbın bel kemiğini oluşturur ve bitkilerdeki şifa bulguları eski bir fikirdir. Antimikrobiyal dirence dayanarak, tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri ve fitokimyasal değerlendirmeleri üzerine araştırmalar yapılmakta ve bu bitkilerin çeşitli bileşenlerinin istenilen amaç doğrultusunda kullanımı sağlanmaktadır (Dada, 2013). Yapılan çalışmalarda, gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkili bazı patojenlerin artan antibiyotik direnci ve tıbbi antibiyotiklerin aşırı tüketimi ile daha da kötüleşmektedir. *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ve *Staphylococcus aureus*'un

patojen suşları, gıda kaynaklı hastalıklarla bağlantılıdır. Güvenli bitki kaynaklı ürünler (bitkiler, fitokimyasallar), gıdalardaki patojenleri azaltmak için yararlı müdahaleler sağlayabilecek bir bileşik kaynağıdır (Friedman, 2007).

Zeytin kültürü, ağırlıklı olarak Akdeniz bölgesinde, 8 milyon ha ekili zeytin ağacının bulunduğu (dünya ekiminin %98'i) en önemli tarımsal faaliyetlerden biridir. Bu rakamlar, ürünün büyük ekonomik ve sosyal önemini ve yan ürünlerinin kullanımından sağlanabilecek muhtemel faydaları ortaya koymaktadır. Zeytin fenollerini ile ilgili yapılan çalışmalar, en yaygın beslenme kaynağı olduğu için zeytinyağı tüketimine odaklanmıştır. Bununla birlikte zeytin bitkisindeki fenolik bileşikler çoğunlukla yapraklarda yoğunlaşmaktadır. Zeytin yaprağı, daha önce meyve hasatının yan ürünleri olduğu için kullanılmamıştır, ancak son zamanlarda ticari olarak değerli nutrasötik bileşenleri ortaya çıkartılmıştır. Zeytinyağı endüstrisinde yapraklar yüksek miktarda bulunmakta (zeytinlerin toplam ağırlığının %10'u) ve zeytin ağaçlarının budaması sırasında elde edilmektedir. Bu hammadde zeytinyağı üretim merkezlerinde biriktiği için düşük maliyetli ve yüksek erişilebilirliğe sahiptir. Ancak ana ilgi zeytinyağı üretiminde yoğunlaştığı için, zeytinyağı üretim merkezlerinde yoğunlaştığından dolayı şimdilik çok sınırlı bir üretkenlik elde edilmektedir. Ayrıca ZYE'nin artan pazarına rağmen, başlıca fenollerin (oleuropein ve hidroksitirasol) absorpsiyonunu ve metabolizmasını inceleyen sınırlı sayıda literatür mevcuttur (de Bock ve ark., 2013; Tabera ve ark., 2004).

Gıdaların bozulmasını önlemek veya geciktirmek için uçucu yağlar ve bitki ekstraktlarını doğal bir gıda katkı maddesi olarak kullanmaya yönelik araştırmalar yaygınlaşmaktadır (Bubonja-Sonje ve ark., 2011). Son yıllarda doğal, organik ve koruyucu olmayan gıdalar için tüketici talebinin arttığını gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ZYE'ye olan talepler yüksek fenolik içeriği nedeniyle gıda maddeleri, gıda katkı maddeleri olarak kullanım için artmaktadır (Lee ve Lee, 2010).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Analizlerde kullanılan çözücüler (etanol, metanol, asetonitril, kloroform), kimyasallar (Folin-Ciocalteu, sodyum karbonat, gallik asit, potasyum asetat, alüminyum nitrat, kuersetin, 2,2-difenil-1-pikrihidrazil, troloks, bakır klorür, neokuproin, amonyum asetat, asetik asit, oleuropein, Span 60, kolesterol, potasyum klorür) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Besiyerleri (Nutrient agar, Listeria Identification Agar Base (PALCAM), Eosin Methylen-blue Lactose Sucrose (EMB) agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, Mueller-Hinton Broth (MHB) ve agar agar) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Çizelge 3.1. Analiz edilen zeytin yaprağı çeşitleri

1	Arbequine	10	Memecik	19	Cassanese
2	Ascolana	11	Negral	20	Chiastrone
3	Ayvalık	12	Samanlı	21	Cima di Bitetto
4	Domat	13	Uslu	22	Leccino
5	Edincik Su	14	Verdial	23	Ogliarola
6	Gemlik	15	Coratina 1	24	Peranzana
7	Gordales	16	Coratina 2 (Basilicata)	25	Yabani (Bari)
8	Karamürsel Su	17	Coratina 3 (Campania)		
9	Manzanilla	18	Carolea		

Projenin ilk aşamasında incelenen 14 adet zeytin yaprağı örneği Edremit Zeytin Üretim, Eğitim ve Gen Merkezi Müdürlüğü Gömeç Koleksiyon Parseli'nden (39°23'49"N, 26°50'29"E) 2015 yılı Aralık ayında temin edilmiştir.

Diğer 11 adet zeytin yaprağı örneği ise İtalya'nın Basilicata, Campania ve Bari bölgelerinden 2016 yılı Kasım ayında toplanmıştır.

Örnekler kurutma işlemine kadar -22°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Çalışma kapsamındaki analizler 2 tekerrür olarak planlanmış ve her bir tekerrür için 3'er paralel olacak şekilde yapılmıştır.

3.2. Deneme Planı

Çalışmanın birinci aşamasında, ZYE'lerin hazırlanması için kurutma, öğütme ve ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan ZYE'lere toplam fenol ve toplam flavonoid analizi, antioksidan aktivite analizleri (CUPRAC; DPPH) ve oleuropein içeriğinin belirlenmesi amacıyla HPLC analizi yapılmıştır.

İkinci aşamada, daha önce yapılan HPLC analizine göre en yüksek oleuropein içeren ZYE seçilerek, *E.coli*, *S.typhimurium*, *L.innocua* ve MRSA mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite broth mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemin sağlaması geleneksel yöntem olarak dökme plak yöntemiyle toplam bakteri sayısı belirlenerek yapılmıştır.

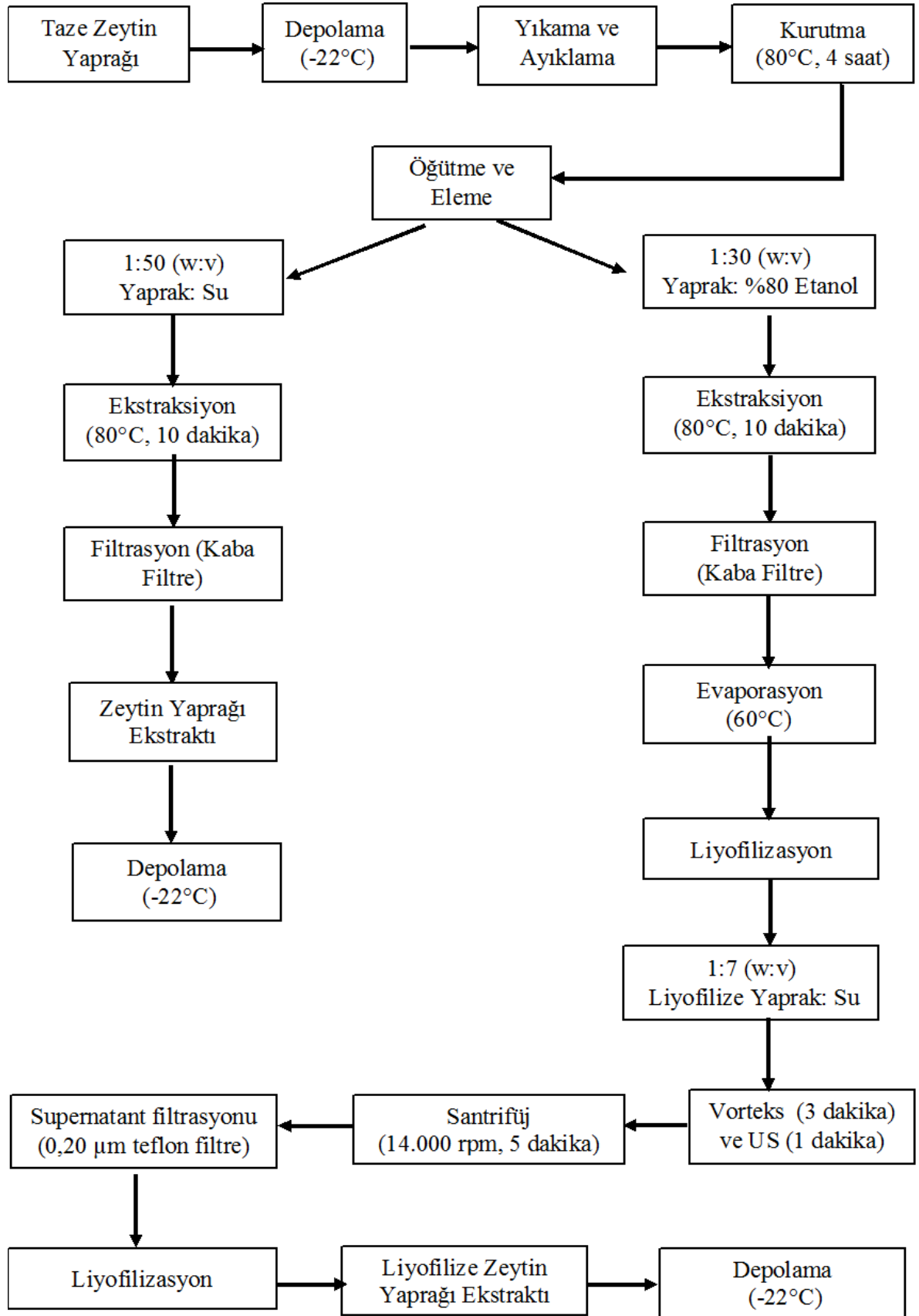
ZYE yüklü niozomlar ve boş niozomlar ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlanmış, ultrasonik banyo ile boyut küçültülmüştür. Hazırlanan veziküllerin karakterizasyonu için enkapsülasyon verimi (%EE), ortalama partikül boyutu ve zeta potansiyeli analizleri yapılmıştır. Morfolojik yapının incelenmesi amacıyla ışık mikroskobu, TEM ve SEM'de niozomların görüntüleri alınmıştır.

Hazırlanan ZYE yüklü ve boş niozomların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla broth mikrodilüsyon yöntemi daha önce kullanılan dört mikroorganizma için uygulanmış ve toplam bakteri sayımı ile yöntem doğrulaması yapılmıştır.

3.2.1. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Hazırlanması ve Analizleri

3.2.1.1. Zeytin Yapraklarının Kurutulması ve Öğütülmesi

Zeytin yaprakları dallarından temizlenmiş ve distile sudan geçirilerek yaprak üzerindeki toz ve benzeri yabancı maddeler uzaklaştırılmıştır. Suyu süzülen zeytin yaprakları kurutma amacıyla kaba filtre kâğıdının üzerine homojen bir şekilde yayılmış ve etüvde (ECOCELL-MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, İsviçre) 80°C'de 4 saat kurutmaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi takiben yapraklar laboratuvar tipi öğütücü (Waring Blender 8011EG, Amerika) kullanılarak öğütülmüş ve standart öğütme büyüklüğün sağlanması amacıyla da 850 nm delik çapına sahip bir elek yardımıyla elenerek elek altında kalan kısım alınmıştır.



Şekil 3.1. ZYE ve liyofilize zeytin yaprağı üretim akım şeması

3.2.1.2. Zeytin Yapraklarının Su ile Ekstraksiyonu

Zeytin yaprağı ekstraktlarının hazırlanmasında (Şekil 3.1) Şimşek ve ark. (2016)'nın ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Zeytin yaprağı tozuna 1:50 (w/v) oranında kaynatılmış distile su eklenerek karışım 80°C'de su banyosunda (Memmert WNB 10, Almanya) 10 dakika bekletilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında yaprak-su karışımı kaba filtreden geçirilerek filtre edilmiş ve elde edilen ZYE'ler -22°C'de muhafaza edilmiştir.

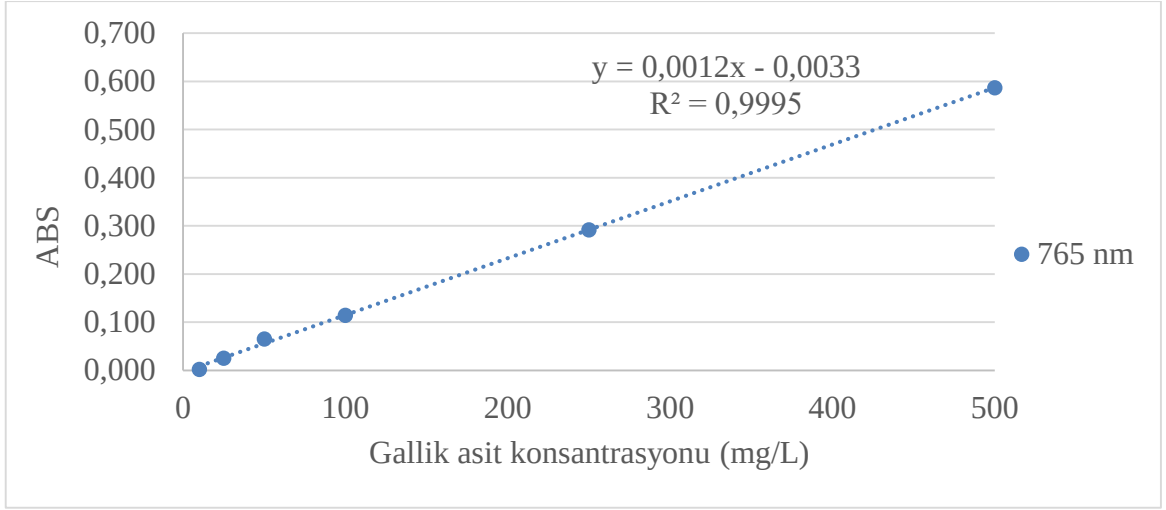
3.2.1.3. Niozom Üretimi İçin Zeytin Yapraklarının Ekstraksiyonu

Niozom üretiminde etken madde olarak kullanılacak ZYE'nin hazırlanmasında (Şekil 3.1) Şimşek ve ark. (2016)'nın ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Örnekler 1:30 (w/v) oranda %80 etanol ile 80°C'de 10 dakika su banyosunda bekletilmiş ve ekstraktlar kaba filtreden geçirilmiştir. Filtrasyon işlemi sonrasında Rotary Evaporatör (Büchi Rotavapor R-300, İsviçre) yardımıyla filtratlardan etanol uzaklaştırılmış ve evapore edilen örnekler liyofizatör ile (Christ, Almanya) dondurularak kurutulmuştur.

Liyofilize örnekler (1:7) (w/v) oranında distile su ilave edilmiş ve örnekler 3 dakika vorteks (Velp Scientifica, ZX3 Advanced Vortex Mixer, İtalya) ve 1 dakika ultrasonik banyo (Isolab, Laborgeräe GmbH, Almanya) uygulanmıştır. Çözündürülen örnekler 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Centurion Scientific, İngiltere) edilerek supernatant kısım alınmıştır. Toplanan supernatant kısımlar 0.20 µm teflon filtreden geçirilmiş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize örnekler -22°C'de ağzı kapalı kaplarda muhafaza edilmiştir.

3.2.1.4. Toplam Fenol Tayini

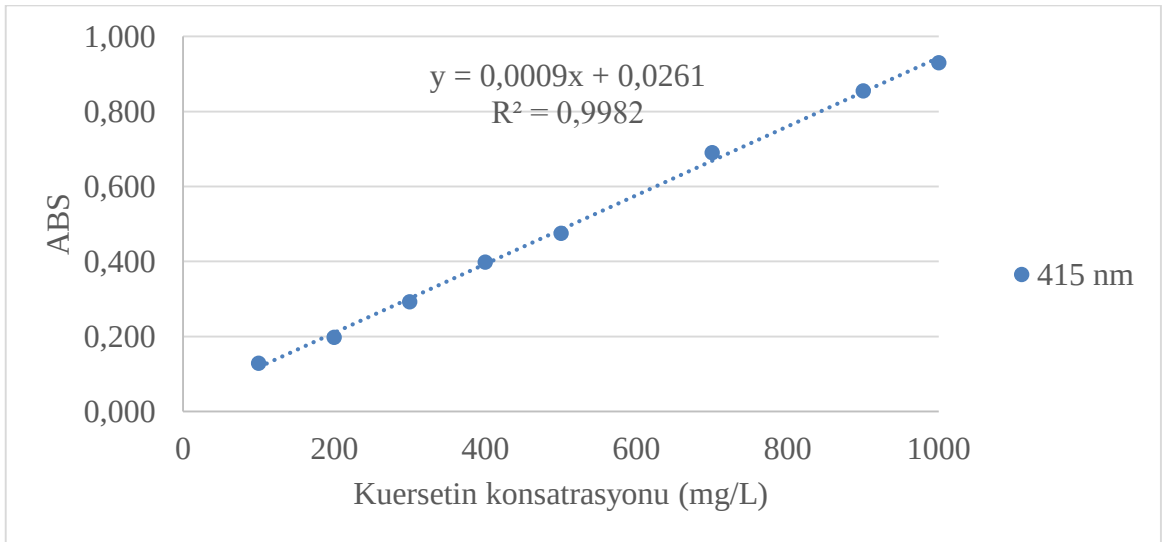
Zeytin yaprağı ekstraktlarının toplam fenolik miktarının belirlenebilmesi amacıyla Singleton ve Rossi, (1965)'nin Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. 100 µL ZYE, 900 µL distile su, 5 mL 0,2 N Folin-Ciocalteu çözeltisi ve 4 mL %7,5 sodyum karbonat çözeltisi sırasıyla deney tüpüne eklenmiş ve vorteks uygulanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında, karanlıkta 2 saat inkübasyona bırakılmış ve spektrofotometrede (Thermo Scientific, Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, USA) 765 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Standart eğri grafiği gallik asit ile çizilmiş ve ZYE'lerin toplam fenol miktarı "mg GAE/L" cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.2. Toplam fenol tayini için gallik asit standart eğrisi

3.2.1.5. Toplam Flavonoid Tayini

Zeytin yaprağı ekstraktlarının toplam flavonoid miktarının belirlenebilmesi amacıyla Chang ve ark. (2002)'nin yöntemi kullanılmıştır. 100 µL ZYE, 100 µL 1 M potasyum asetat, 100 µL %10'luk alüminyum nitrat, 4,4 ml %96'lık etanol sırasıyla deney tüplerine eklenmiş ve vorteks uygulanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübasyona bırakılmış ve spektrofotometrede 415 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Standart eğri grafiği kuersetin ile çizilmiş ve ZYE'lerin toplam flavonoid miktarı "mg QE/L" cinsinden verilmiştir.



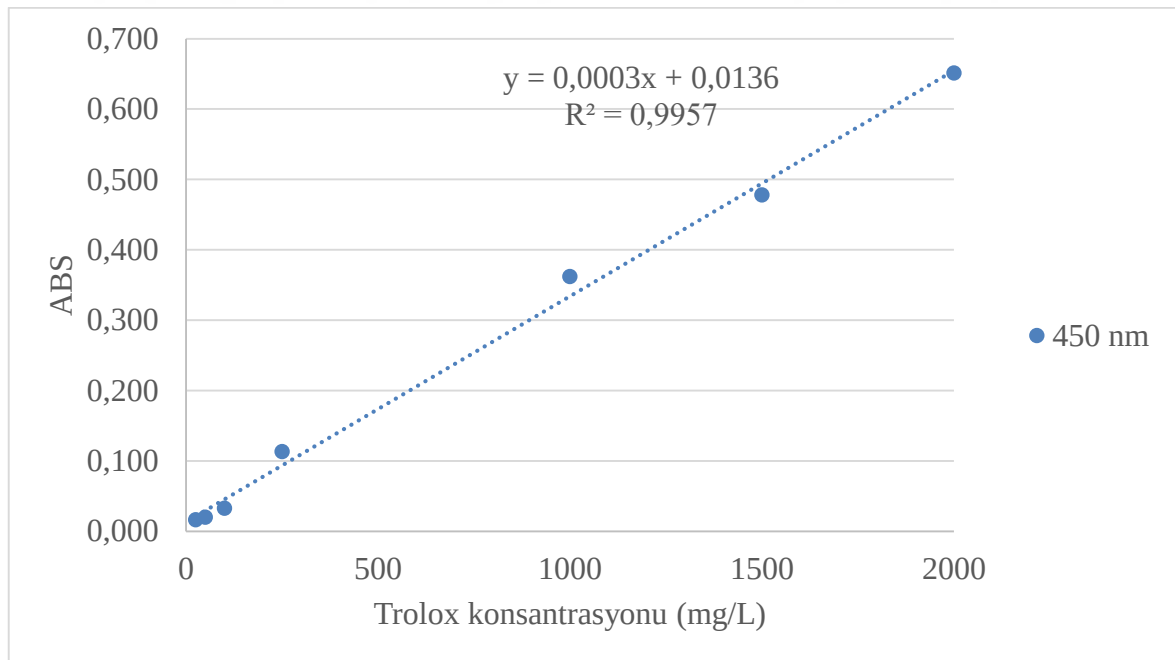
Şekil 3.3. Toplam flavonoid tayini için kuersetin standart eğrisi

3.2.1.6. 2,2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi

Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinden biri olan ve Benvenuti ve ark. (2004) tarafından önerilen DPPH yöntemi kullanılmıştır. DPPH radikali analize başlamadan 6 saat öncesinde metanol ile hazırlanmıştır. Deney tüplerine 20, 40, 60, 80, 100 µL ZYE alınmış 300 µL 1 mM DPPH radikali ilave edilmiştir. Tüplere toplam hacim 3 mL olacak şekilde metanol eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakılmış ve spektrofotometrede 517 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Analiz sonuçları IC₅₀ başlangıç DPPH radikalinin %50’sinin inhibisyonu için gereken örnek konsantrasyonu (mg/mL ekstrakt) olarak verilmiştir.

3.2.1.7. CUPRAC (Bakır İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Apak ve ark. (2004) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Deney tüplerine sırasıyla 20 µL ZYE, 1 ml 0,01M bakır klorür çözeltisi, 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin, 1 mL 1 M, pH7,0 amonyum asetat çözeltisi ve 1080 µL distile su eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmış ve spektrofotometrede 450 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Standart eğri grafiği trolox ile çizilmiş ve zeytin yaprağı ekstraktlarının CUPRAC sonuçları kuru yaprak için "mg TE/L" cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.4. CUPRAC tayini için trolox standart eğrisi

3.2.1.8. Oleuropein Tayini

ZYE'lerin oleuropein içeriğinin belirlenebilmesi amacıyla Al-Rimawi (2014) tarafından önerilen kromatografik yöntem kullanılmıştır. Ultrasaf su ile seyreltilen (1:10, v/v) ve 0,45 µm teflon filtreden geçirilen ZYE, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC/DAD), cihazına enjekte edilmiştir. HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir:

HPLC Sistemi: SHIMADZU LC 20A (Japonya)

HPLC kolonu: Inertsil ODS 3 (250 mm, 4.6ID, 5 µ) ters faz kolon

Kolon sıcaklığı: 35°C

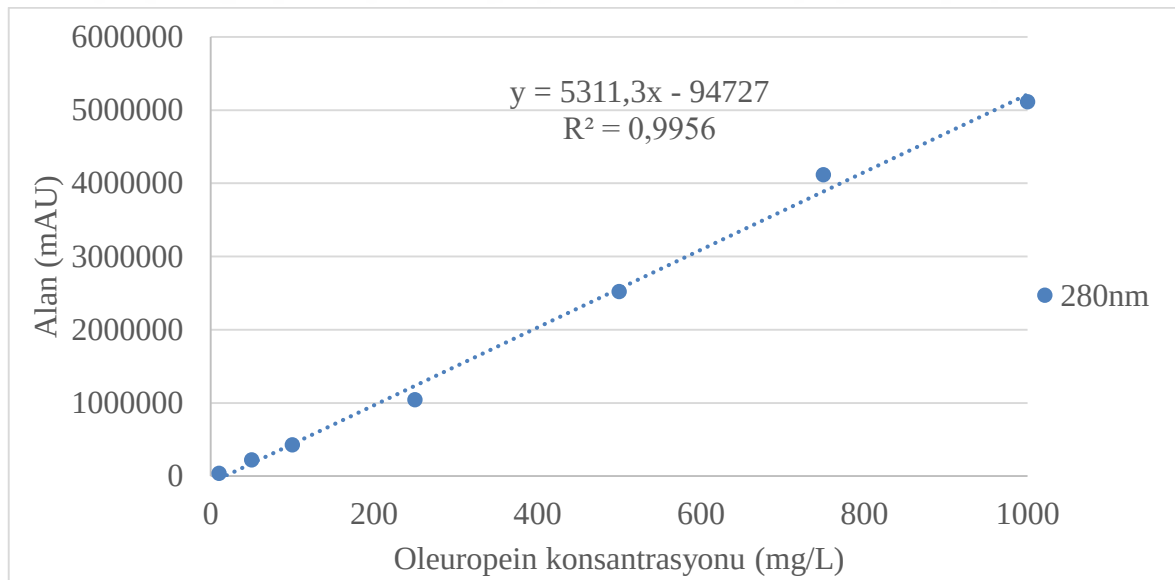
Mobil faz: 80:20 v/v su:asetonitril (pH 3,0'e asetik asitle ayarlanmış), izokratik akış

Akış hızı: 1 mL/dakika

Enjeksiyon miktarı: 20 µL

DAD dedektör: 200-400 nm

ZYE örneğinin 280 nm dalga boyundaki kromatogramında oleuropeine ait pik, oleuropein standart maddesine ait pikin alıkonma zamanı, pik saflığı ve standart madde ile spektrum karşılaştırma sonuçları dikkate alınarak kalitatif olarak belirlenmiştir. Kantitatif analiz ise, 280 nm'de dış standart metodu ile 10-1000 mg/L konsantrasyon aralığında hazırlanan oleuropein standart eğrisi yardımı ile "mg oleuropein/L" olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. Oleuropein tayini için oleuropein standart eğrisi

3.2.2. ZYE Yüklenmiş ve Boş Niozomların Hazırlanması

Niozomların hazırlanmasında Ruckmani ve Sankar (2010) tarafından önerilen ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.6). Veziküllere yüklenecek olan ZYE'nin

hazırlanması ve kapsül üretimi steril koşullarda yapılmıştır.

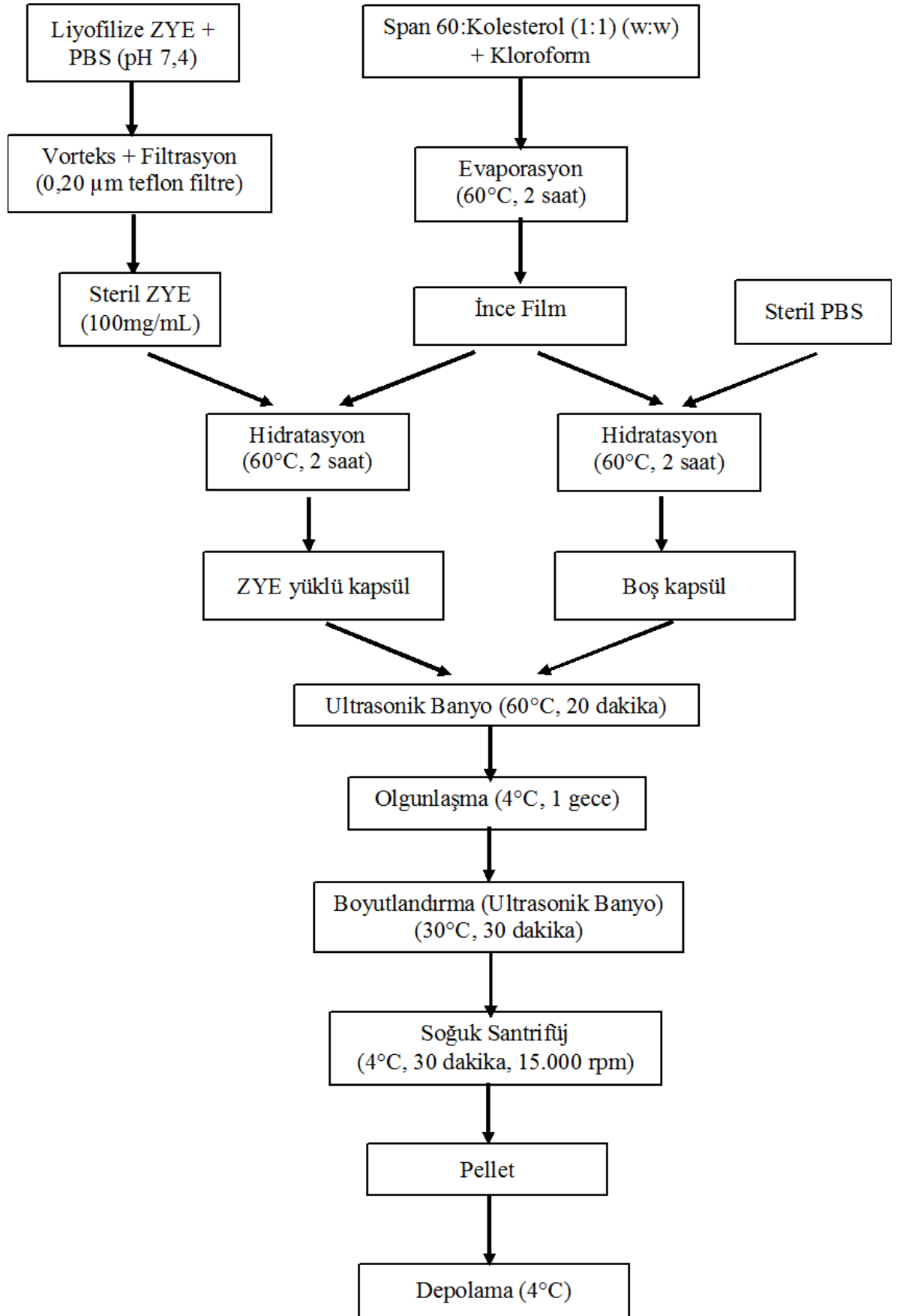
500 mg liyofilize ZYE, 5 ml PBS (pH 7,4) içerisinde vorteks yardımıyla iyice çözündürülmüş ve 0,20 µm'lik teflon filtreden geçirilerek steril bir tüpte toplanmıştır. 500 mg Span 60 ve 500 mg kolesterol (1:1) (w/w) 8 ml kloroform ile 250 mL'lik balonda çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltiden kloroform, rotary evaporator ile (60°C, 2 saat) uzaklaştırılmış ve balonun iç yüzeyinde tamamen kurutulmuş ince film elde edilmiştir.

Hidratasyon işlemi için ince filmin üzerine daha önceden hazırlanan 5 mL 100 mg/mL'lik steril ZYE eklenmiş ve 60°C'de, 150 rpm'de 2 saat boyunca çalkalayıcı inkübatör kullanılarak ince film hidrate edilmiştir. Ek olarak, filmin tamamen çözünmesi için hidrate edilen karışıma 60°C'de 20 dakika ultrasound uygulanmıştır. Boş kapsüllerin hazırlanması için ZYE yerine 5 ml steril PBS ince filme eklenmiştir. Hidratasyon aşamasında span 60'ın jel-sıvı faz geçiş sıcaklığının (50°C) üzerinde bir sıcaklıkta çalışılmıştır.

Hidratasyon sonrası oluşturulan niozomlar 4°C'de 1 gece boyunca olgunlaşmaya bırakılmış ve olgunlaşma sonrası vezikül yapısının incelenmesi amacıyla örnek alınmıştır. Olgunlaşma sonrasında oluşturulan veziküllerin boyutlandırılması amacıyla 30°C, 3 kez 10 dakika ultrasound işlemi uygulanmıştır. Boyutlandırma sonrası da vezikül yapısının incelenmesi amacıyla örnek alınmıştır. Boyutlandırma sonrasında diğer analizler için örnekler 4°C'de depolanmıştır.

3.2.2.1. Santrifüj İle Kapsülenemeyen Etken Madde'nin Uzaklaştırılması

Serbest etken maddenin veziküllerden uzaklaştırılması için Pawar ve ark. (2016)'ın önerdiği yöntem değiştirilerek kullanılmıştır. 1 ml boş ve ZYE yüklü niozomal süspansiyonlar 2 ml'lik steril edilmiş eppendorf tüplerine eklenmiş ve tartılmıştır. Hazırlanan tüpler 4°C, 15.000 rpm'de 30 dakika soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320R, Almanya) ile santrifüj edilmiş ve supernatant, enkapsülasyon veriminin yüzde olarak hesaplanması için ayrılmıştır. Pelletlerin yıkanması amacıyla, pelletlere 1 ml steril PBS eklenerek vortekslenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmış ve ikinci supernatant tekrar ayrılmıştır.



Şekil 3.6. ZYE yüklü ve boş niozomların üretim akım şeması

3.2.2.2. Enkapsülasyon Verimi Tayini

Hazırlanan ve boyutlandırılan niozomların enkapsülasyon verimi için santrifüj ile ayrılan süpernatant kısım kullanılmıştır. Toplam etken madde miktarı ve ilk supernatant kısımdaki serbest etken madde miktarı toplam fenol tayini ile belirlenmiştir. Niozomlar tarafından kapsüllenen etken maddenin yüzdesel miktarı enkapsülasyon verimi olarak tanımlanmaktadır ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (\%)} = \frac{(EM_t - EM_s)}{EM_t} \times 100 \quad (3.1)$$

EM_t= Toplam etken madde miktarı (mg)

EM_s= Serbest etken madde miktarı (mg)

3.2.2.3. Niozomların Partikül Boyutlarının İncelenmesi

Hazırlanan ve boyutlandırılan ZYE yüklü ve boş niozomların ortalama partikül boyutları 90 Plus Parçacık Boyutu Analiz cihazı (Brookhaven Instrument Corp., Amerika) kullanılarak belirlenmiştir. DLS metodunda kullanılmak üzere niozomlar 0,01 M potasyum klorür ile 0,5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve partikül büyüklüğü ölçümü her bir örnek için 2 kez tekrar edilmiştir.

3.2.2.4. Niozomların Zeta Potansiyellerinin Tayini

Zeta potansiyel ölçümleri, PALS tekniğiyle ölçüm yapan ZetaPals Zeta Potansiyel Analiz Cihazı BIC (Brookhaven Inst. Corp., Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Niozomlar 0,01 M potasyum klorür ile 0,25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve zeta potansiyeli ölçümü her bir örnek için 2 kez tekrar edilmiştir.

3.2.2.5. Niozomların Görüntülenmesi

Niozomların morfolojik yapılarının incelenmesi amacıyla ışık mikroskobu (Zeiss, PrimoVert, Almanya), SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japonya) ve TEM (JEOL JEM 1400 Plus TEM, Japonya) görüntüleri alınmıştır.

Işık mikroskobu kullanılarak, farklı büyütme seviyelerinde ZYE yüklü ve boş niozomların olgunlaşma sonrası ve boyutlandırma sonrası görüntüleri alınmıştır.

TEM görüntülerinin alınması için 300 mg niozoma 1 ml distile su eklenmiş ve örnek 25°C, 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant kısım uzaklaştırılmıştır. İşlem

iki kez daha tekrar edilmiş ve PBS örnekten uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletten distile su ile 100 mg/mL’lik niozomal dispersiyon hazırlanmıştır. Numuneler karbon destekli bakır gridlerin (300 mesh) üzerine tutundurulmuş ve 120 kV’da görüntüler alınmıştır.

SEM görüntülerinin alınmasında TEM için hazırlanan niozomal dispersiyon 10 kat seyreltilmiş ve 100 µL örnek lamel üzerine damlatılarak oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan numuneler Paladyum-Altın ile kaplanmış ve yüzey görüntüleri 10kV’de ve yüksek vakumda farklı büyütme seviyelerinde alınmıştır.

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Mikrobiyal Kültürlerin Çoğaltılması ve Saklanması

L.innocua için suplement ile zenginleştirilmiş PALCAM, *E.coli* için EMB Agar, *S.typhimurium* için XLD Agar ve MRSA için MHA besiyerleri hazırlanmış ve sürme yöntemi uygulanmıştır. 37°C’de 24 saat inkübe edilerek geliştirilen mikroorganizmalardan tek koloni alınarak depolama amacıyla hazırlanan yatık NA üzerine aktarılmış ve mikroorganizmalar -22°C’de depolanmıştır. Her 3 ayda bir yatık stok kültürler yenilenmiştir.

3.2.3.2. Mikroorganizma Konsantrasyonunun Ayarlanması

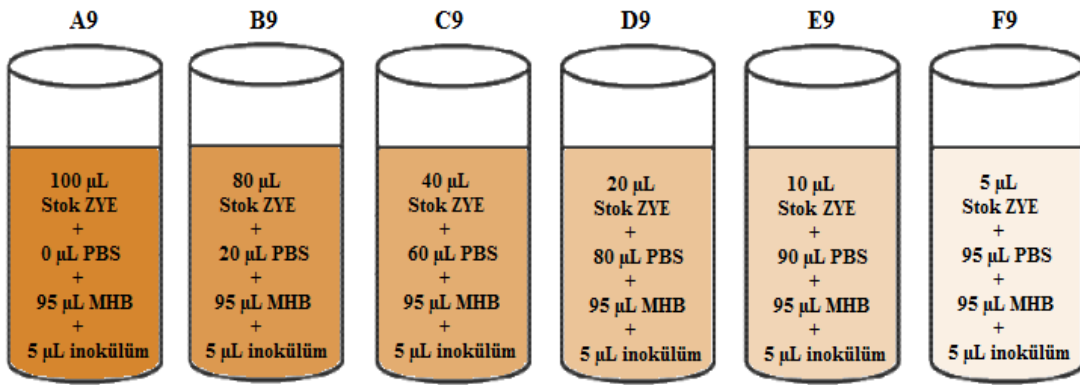
37°C’de 18 saat inkübe edilerek geliştirilen mikroorganizmalar 0,5 McFarland eşelinde (10^8 CFU/mL) olacak şekilde spektrofotometrede 625 nm’de ayarlanmıştır. 0,5 McFarland eşelinde hazırlanan mikroorganizmalar MHB ile 10^7 CFU/mL’ye seyreltilmiştir.

3.2.3.3. ZYE, Boş Kapsül ve ZYE Yüklü Kapsülün Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

ZYE’nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Kuete ve ark. (2007) tarafından önerilen broth mikrodilüsyon yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Yöntemde kullanılmak üzere liyofilize ZYE, ZYE yüklenmiş kapsül ve boş kapsül hazırlanmıştır.

Liyofilize ZYE steril PBS (pH 7,4) içerisinde çözündürülerek 750 mg/mL konsantrasyonda stok ZYE çözeltisi hazırlanmıştır. Vorteks uygulanarak iyice karıştırılmış çözelti 0.20 µm’lik teflon filtreden geçirilerek steril bir tüpte toplanmıştır. *L.innocua*, *E.coli* ve *S.typhimurium* için 750 mg/mL stok ZYE çözeltisi PBS ile seyreltilerek 750-37,5 mg/mL arası toplamda 6 konsantrasyon, MRSA için ise 75-0,29 mg/mL arası toplamda 9 konsantrasyon hazırlanmıştır.

Hazırlanan ve serbest etkin maddenin uzaklaştırıldığı niozomlara konsantrasyon 300 mg/mL olacak şekilde steril PBS eklenmiştir. Niozomal dispersiyona vorteks uygulanarak iyice karıştırılmıştır. 300 mg/mL’lik stok niozomal dispersiyon PBS ile seyreltilerek *L.innocua*, *E.coli* ve *S.typhimurium* için 300-6,25 mg/mL arası toplamda 7 konsantrasyon, MRSA için ise 200-6,25 mg/mL arası toplamda 6 konsantrasyon hazırlanmıştır. Boş kapsüller aynı işlem basamakları uygulanarak kapsüller ile aynı konsantrasyonda hazırlanmıştır.

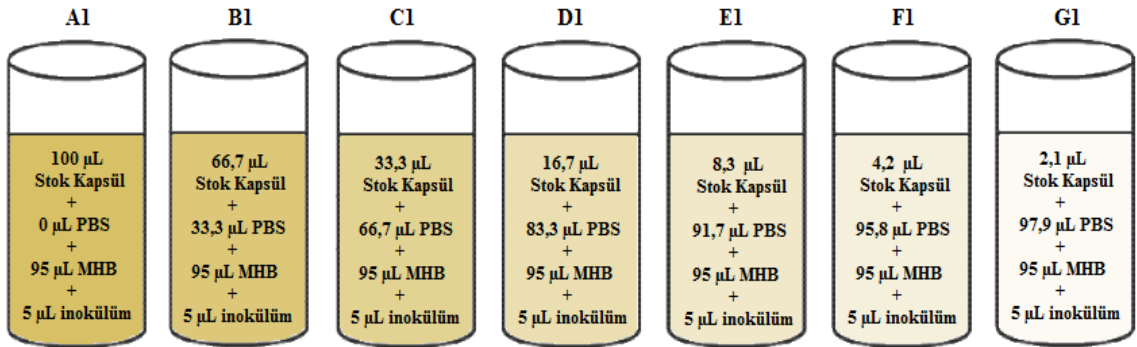


Şekil 3.7. ZYE’nin MİK değerinin belirlenmesi için hazırlanan kuyucukların şematik gösterimi

ZYE’nin MİK değerinin belirlenmesi amacıyla steril 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrotitrasyon plakasının A9 kuyucuğuna (Şekil 3.7) 100 µL ZYE ve 95 µL MHB pipetlenmiştir. İnokulumun direkt olarak ZYE ile karşılaşmaması için kuyucuk pipet ucuyla iyice karıştırılmıştır. Karışımın üzerine daha önceden hazırlanan 10^7 CFU/mL konsantrasyondaki inokülümden 5 µL eklenmiştir. Son hacmin 200 µL olduğu kuyucukta son inokülüm konsantrasyonu 10^5 CFU/mL’dir. Ekstraktın kontrolü için inokülüm ilave edilmeden 100 µL ZYE ve 100 µL MHB kuyucuğa eklenerek karıştırılmıştır. Aynı işlem hazırlanan diğer konsantrasyonlardaki ZYE’ler için kolonun devamında 2 paralel olacak şekilde tekrar edilmiştir.

ZYE yüklenmiş niozomların ve boş niozomların MIC değerlerinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu düztabanlı mikrotitrasyon plakasının A1 kuyucuğuna (Şekil 3.8) 100 µL niozom, 95 µL MHB pipetlenmiş ve pipet ucuyla iyice karıştırılmıştır. Karışımın üzerine daha önceden hazırlanan 10^7 CFU/mL konsantrasyondaki inokülümden 5 µL eklenmiştir. Yüklü niozomların kontrolü için inokulum ilave edilmeden 100 µL niozom ve 100 µL MHB kuyucuğa eklenerek karıştırılmıştır. Aynı işlem hazırlanan diğer konsantrasyonlardaki yüklü

niozomlar ve boş niozomlar için kolonun devamında 2 paralel olacak şekilde tekrar edilmiştir.



Şekil 3.8. ZYE yüklü kapsülün MİK değerinin belirlenmesi için hazırlanan kuyucukların şematik gösterimi

Mikroorganizmanın gelişiminin kontrolü için 195 µL MHB ve 10^7 CFU/mL konsantrasyondaki inokülüm 5 µL hacimde kuyucuğa pipetlenmiştir. Sterilite kontrolü için ise 200 µL MHB diğer bir kuyucuğa pipetlenmiştir. İnokülüm gelişimi ve sterilite örnekleri 2 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan mikrotitrasyon plakasının üzeri film (Platemax) ile kaplanarak spektrofotometrede 37°C’de 18 saat çalkalama yapılarak inkübe edilmiş ve saat başı 620 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.2.3.4. Toplam Canlı Sayımı

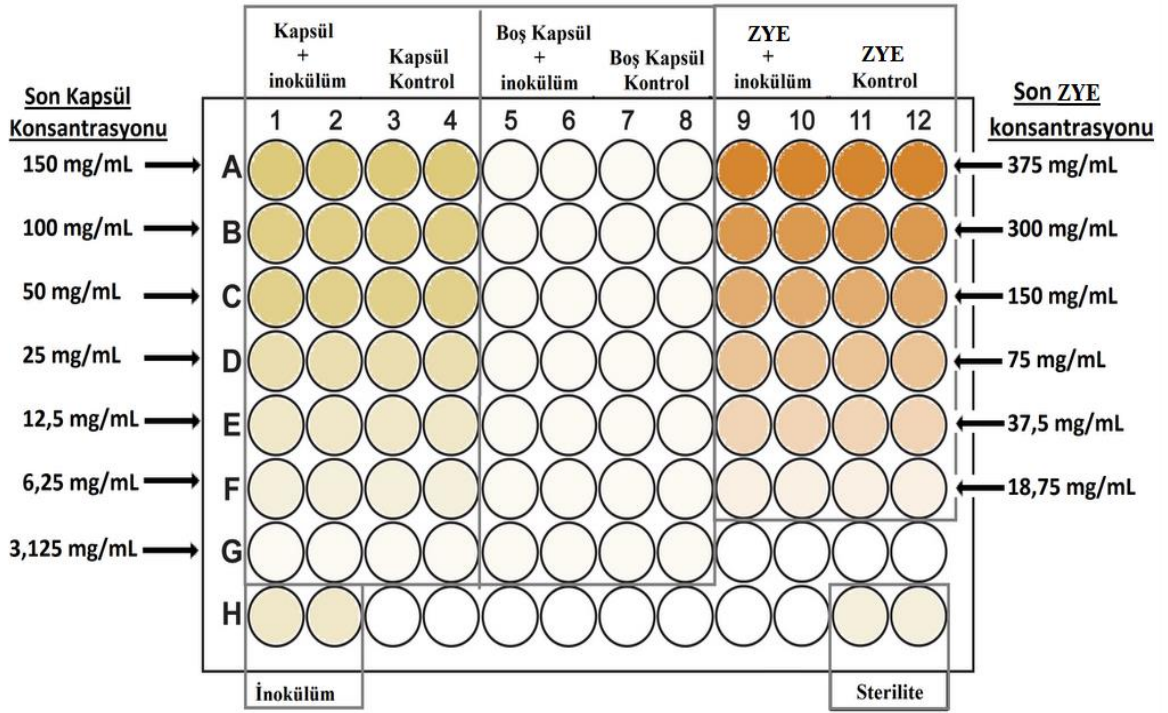
ZYE’nin mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen MIC değerinin sağlamlasının yapılması amacıyla steril 2 mL’lik kapaklı Eppendorf tüpüne 250 µL 300 mg/mL ZYE ve 237.5 µL (MHB) eklenerek vortekslenmiştir. İyice karıştırılan örneğe 12.5 µL 10^7 CFU/mL inokülüm eklenerek tekrar vorteks uygulanmıştır.

ZYE yüklenmiş niozom veya boş niozom için tüpe 250 µL 300 mg/mL kapsül veya boş kapsül ve 237.5 µL MHB eklenerek vortekslenmiştir. İyice karıştırılan örneğe 12.5 µL 10^7 CFU/mL inokülüm eklenerek vorteks uygulanmıştır.

İnokülümün gelişiminin incelenmesi için tüpe 487.5 µL MHB ve 12.5 µL 10^7 CFU/mL inokulum eklenerek vorteks uygulanmıştır. Tüm örnekler için son hacim 500 µL ve son inokülüm konsantrasyonu 10^5 CFU/mL’dir.

Hazırlanan tüpler 37 °C’de 18 saat inkübe edilmiş ve inkübasyonun 0. ve 18. saatinde tüplerden örnek alınmıştır. %0,1 peptonlu su ile dilüsyonları hazırlanan örnekten 100 µL alınarak MHA’a yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Hazırlanan petriler 37°C’de 18

saat inkübasyona bırakılmış ve gelişen koloniler değerlendirilmiştir.



Şekil 3.9. *E.coli*, *L.innocua*, *S.typhimurium* için ZYE, ZYE yüklü ve boş kapsülün MİK değerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasının şematik gösterimi

Koloni sayısının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d] \quad (3.2)$$

N = Gıda örneğinin 1 gram ya da 1 mL'sinde mikroorganizma sayısı

C = Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim (mL)

n_1 = İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

n_2 = İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

d = Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranı

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SAS V9 (SAS 1999) istatistik paket programının MIXED prosedürü kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Farklı Çeşit Zeytin Yapağı Ekstraktlarının Biyoaktif Bileşenleri

Zeytin yaprakları daha etkin bir ekstraksiyon, yaprakların su aktivitesinin azaltılması ve enzimatik faaliyetlerin yıkımının azaltılması amaçlarıyla 80°C’de 4 saat kurutulmuştur. Kurutma öncesi ve sonrası yaprakların görünüşleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Kurutulan yapraklar öğütülmüş ve standart bir boyut elde edilmesi için elenerek kullanılmıştır. Eleme sonrası tozlar serin ve karanlık ortamda saklanmıştır.

Farklı çeşit zeytin yaprakların biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla sulu ekstraktlar zeytin yapağı tozuna 1:50 (w/v) oranında kaynar durumda distile su eklenerek 80°C’de 10 dakika infüzyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Filtre edilen ekstraktlar fenolik bileşenlerinin kaybının engellenmesi amacıyla analiz edilinceye kadar -22°C’de, karanlıkta depolanmıştır. İnfüzyon yöntemi, bitkisel ilaç yapımında kullanılan basit ve düşük maliyetli geleneksel bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Sulu ekstraktlarda fenolik bileşenlerin özümlemesinin sınırlı olabildiği ve kaynama işlemi sırasında bileşenlerin yapıları bozulabileceği bildirilmiştir (Luo, 2011).



Şekil 4.1. Manzanilla örneği 80°C’de 4 saat kurutma öncesi (A) ve sonrası (B); Peranzana örneği 80°C’de 4 saat kurutma öncesi (C) ve sonrası (D)

Niozom üretiminde kullanılacak olan ekstraktların hazırlanmasında ise ön denemelerde daha yüksek oleuropein ekstraksiyonun gerçekleşmesi nedeniyle zeytin yapağı tozuna 1:30 (w/v) oranında %80 etanol eklenmiş ve 80°C’de 10 dakika infüzyon gerçekleştirilmiştir. Filtre edildikten sonra etanolün rotary evaporatör ile uzaklaştırıldığı

ekstratlar liyofilize edilmiştir. Liyofilize sonrası örneklerle (1:7) (w/v) oranında distile su ilave edilmiş, karıştırma ve ultrases uygulanmıştır. Suda çözünmeyen kısımlar santrifüj ile ayrılarak supernatant kısım alınmıştır. Filtre edilen supernatant fenolik bileşenlerinin kaybının engellenmesi amacıyla analiz edilinceye kadar -22°C’de, karanlıkta depolanmıştır.

ZYE'lerin fenolik ve flavonoid içeriğinin farklı olması yaprağın çeşidi ve ekstraksiyon için uygulanan yöntemlerin (ekstraksiyon tekniği, kullanılan çözgen tipi ve ekstraksiyon süresi) çeşitliliği ile ilişkilendirilmiştir (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012). Ekstraksiyon için solvent seçimi, istenen bileşenlerin itki materyalinden çıkarılmasında en önemli kriterlerden biridir (Altıok ve ark., 2008).

Bitkilerden polifenollerin geri kazanımı, ekstraksiyon için kullanılan çözücü içerisinde fenolik bileşiklerin çözünürlüğüne ve çözücü polaritesine göre değişmektedir. Alkolik solventler fenolikleri doğal kaynaklardan çıkarmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çözünür fenolik bileşikler genellikle su, metanol, etanol ve aseton kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Yapıda bağlı şekerlerin varlığı ile fenolik bileşikler suda daha fazla çözünmektedir ve dolayısıyla bu çözücülerin su ile kombinasyonları glikozitler için daha iyidir (Abaza ve ark., 2011). Ekstraktlardaki toksik kalıntıların varlığı nedeniyle metanol insan tüketimi için hazırlanan ekstraktların hazırlanmasında uygun bir çözgen olarak düşünülmemektedir (Luo, 2011). Etanol toksik olmayan etkisi, çevresel olarak güvenli rolü ve ucuz oluşuyla daha fazla tercih edilen bir çözücü olarak seçilmiştir (Altıok ve ark., 2008).

Sıcak su ile matanol:su karşılaştırıldığında zeytin yapraklarının sıcak su ile ekstraksiyonu fenolik bileşenlerin ekstraksiyon verimini arttırdığı raporlanmıştır (Silva ve ark., 2006). Altıok (2008) tarafından yapılan çalışmada su, su:etanol ve su:aseton ekstraksiyonları incelenmiş ve en yüksek TPC %70 etanol ile yapılan ekstraksiyonda sağlanmıştır. Etanol toksik olmayan etkisi, çevresel olarak güvenli rolü ve ucuz oluşuyla daha fazla tercih edilen bir çözücü olarak seçilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için çözücü olarak etanol ve su kullanılmış ve ekstraksiyon verimliliği değerlendirilmiştir. %80 etanol ekstraksiyonu sonrası liyofilize edilen örnekler su ile ikinci kez ekstrakte edilmiş ve verim %68,83±2,99 olarak belirlenmiştir.

4.1.1. Farklı Çeşit Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının Toplam Fenol ve Flavonoid İçerikleri

Akdeniz diyetinde zeytin ve ürünleri, zengin fenolik içeriği ve sağlığa yararlarıyla önemli bir yer edinmiştir (Benavente-García ve ark., 2000). Flavonoidler bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerin en yaygın grubudur ve antioksidan aktiviteleri ile de yaygın olarak

bilinmektedirler (Spencer, 2008). Zeytin meyveleri barındırdığı fenolik bileşenlerin çeşitliliğiyle ön plana çıkmaktadır (Ciriminna ve ark., 2016). Bununla birlikte zeytin yaprağının zeytin meyvesinden daha fazla polifenol içerdiği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Petridis ve ark. (2012) tarafından 11 çeşit zeytin meyvesi ve yaprağının toplam fenol miktarları incelenmiştir. Tüm çeşitler için yaprakta bulunan toplam fenol miktarı meyvelere göre daha fazladır.

Çizelge 4.1. Türkiye’den toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı

Örnek	TPC (mg GAE/g km)	TFC (mg QE/g km)
1 Arbequine	11,67 ± 1,91a	2,25 ± 0,40a
2 Ascolana	9,89 ± 0,61abd	1,38 ± 0,03bdf
3 Ayvalık	10,95 ± 0,79a	1,42 ± 0,15bdf
4 Domat	11,51 ± 0,52ac	1,33 ± 0,34bdf
5 Edincik Su	8,01 ± 0,29bd	0,99 ± 0,02bf
6 Gemlik	6,29 ± 0,74d	0,18 ± 0,18c
7 Gordales	10,27 ± 1,94ab	1,02 ± 0,52bf
8 Karamürsel Su	10,76 ± 1,06ab	1,23 ± 0,04bdf
9 Manzanilla	15,12 ± 3,08e	3,38 ± 0,38e
10 Memecik	11,11 ± 1,58a	1,50 ± 0,66bd
11 Negral	10,39 ± 0,52ab	1,80 ± 0,32ad
12 Samanlı	13,96 ± 1,70ce	3,11 ± 0,35e
13 Uslu	8,17 ± 0,65bd	1,54 ± 0,04b
14 Verdial	7,21 ± 1,03d	0,75 ± 0,33cf
±Std. Hata	0,98	0,23

Sonuçlar “Ortalama±SD”olarak verilmiştir (n=2).

Farklı küçük harflerle (a-f) gösterilen sütun değerleri birbirinden farklıdır (P< 0,05).

ZYE’lerin toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu (F-C) reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Standart madde olarak gallik asit kullanılmış ve sonuçlar gram kuru yaprak başına mg gallik asit olarak ifade edilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi, politunston gibi metalleri içermektedir. Örnekteki fenolik bileşenler metalleri indirgeyerek rengi sarıdan Prusya mavisine dönüştürmektedir. Mavi rengin yoğunluğu fenolik içerik miktarı ile doğru orantılıdır (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012).

ZYE'lerin toplam flavonoid miktarı için ise kuersetin standardı kullanılmış ve sonuçlar mg QE/g km olarak verilmiştir. Zeytin yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların toplam fenol ve flavonoid miktarı Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Türkiyeden toplanan 14 adet zeytin yaprağından elde edilen ZYE'ler karşılaştırıldığında 15,12±3,08 mg GAE/g km ile en yüksek TPC Manzanilla çeşidinden hazırlanan örnekte, en düşük TPC ise 6,29±0,74 mg GAE/g km ile Gemlik çeşidinden hazırlanan örnekte belirlenmiştir. TFC ise 0,18±0,18 ile 3,38±0,38 mg QE/g km aralığında değişmekte ve en yüksek değer TPC miktarında olduğu gibi Manzanilla çeşidinden hazırlanan ZYE'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. İtalya'dan toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE'lerin toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı

Örnek	TPC (mg GAE/g km)	TFC (mg QE/g km)
1 Coratina 1	30,03 ± 0,40a	2,73 ± 0,32a
2 Coratina 2 (Basilicata)	35,22 ± 0,98b	3,54 ± 0,08b
3 Coratina 3 (Campania)	16,51 ± 0,22c	1,03 ± 0,02c
4 Carolea	18,04 ± 0,91c	1,27 ± 0,01c
5 Cassanese	31,26 ± 0,83a	3,57 ± 0,30b
6 Chiastrone	41,87 ± 1,07d	2,25 ± 0,07d
7 Cima di Bitetto	35,38 ± 0,73b	2,94 ± 0,39a
8 Leccino	31,39 ± 0,10a	2,42 ± 0,15a
9 Ogliarola	23,70 ± 0,85e	1,74 ± 0,19e
10 Peranzana	49,36 ± 0,64f	3,63 ± 0,28b
11 Yabani (Bari)	27,67 ± 0,64g	2,59 ± 0,12a
±Std. Hata	0,52	0,15

Sonuçlar "Ortalama±SD"olarak verilmiştir (n=2).

Farklı küçük harflerle (a-g) gösterilen sütun değerleri birbirinden farklıdır (P< 0,05).

İtalya'dan toplanan yapraklar için en yüksek TPC (49,36±0,65 mg GAE/g km) Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'de, en düşük TPC (16,51±0,22 mg GAE/g km) Campano bölgesinden toplanan Coratina 3 örneğinde belirlenmiştir. Örnekler için TFC aralığı 1,03±0,02 ile 3,63±0,28 mg QE/g km olarak bulunmuş ve tüm örnekler arasında en

yüksek flavonoid içeriğine sahip olan örneğin Peranzana'dan elde edilen ZYE olduğu görülmüştür.

Mahmoudi ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada Cezayir menşeli 10 çeşit zeytin yaprağından ekstrakt hazırlanmıştır. Metanolik ekstraktlarda en yüksek TPC Bither çeşidinden hazırlanan ZYE'de $52,29 \pm 5,2$ mg GAE/g km, en yüksek TFC ise Cahtwi çeşidinden hazırlanan ZYE'de $14,39 \pm 0,33$ mg QE/g km olarak belirlenmiştir.

Khaliqve ark. (2015) tarafından Coratina, Gemlik ve Uslu çeşitlerinin de içinde bulunduğu 8 çeşitten elde edilen ZYE'lerin fenolik ve flavonoid içerikleri incelenmiştir. Sıcak su ile ekstraksiyonu yapılan örneklerden elde edilen ZYE'ler için TPC $109,60 \pm 3,68$ ile $161,00 \pm 1,90$ mg GAE/g ekstrakt arasında bulunmuştur. TFC ise $42,00 \pm 1,97$ ile $57,00$ mg/g ekstrakt aralığında bildirilmiştir. Toplam fenol ve flavonoid içeriği bakımından en yüksek sonucu Gemlik örneği vermiştir.

Abaza ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada Chétoui çeşidinin su ile ekstraksiyonundan elde edilen ZYE'nin toplam fenol miktarını $16,52 \pm 0,62$ mg GAE/g km olarak belirlemiştir. Chemlali çeşidinin su ile ekstraksiyonundan elde edilen ZYE'nin toplam fenol içeriği ise $10,5 \pm 1,23$ mg GAE/g km olarak bildirilmiştir (Debib ve Boukhatem, 2017). Goldsmith ve ark. (2015), Corregiola ve Frantoio zeytin çeşitlerinden sulu ekstraksiyon ile hazırlanan ZYE'lerin fenolik miktarı sırasıyla $230,15 \pm 6,85$ ve $233,45 \pm 0,20$ mg GAE/g ekstrakt olarak rapor etmiştir. Ben Salah ve Abdelmelek (2012) İspanya, İtalya, Tunus ve Fransa'dan toplamda 8 çeşit zeytin yaprağından hazırlanan ZYE'lerin fenolik miktarı incelemiştir. %70 etanol ile yapılan ekstraksiyonda TPC $73,05 \pm 15,52$ ile $144,19 \pm 10,27$ mg GAE/g km olarak değişmektedir. Metanolik ekstraksiyon ile hazırlanan ZYE için TFC gram kuru yaprakta $21,45 \pm 1,20$ mg QE olarak belirlenmiştir (Morsy ve Abdel-Aziz, 2014).

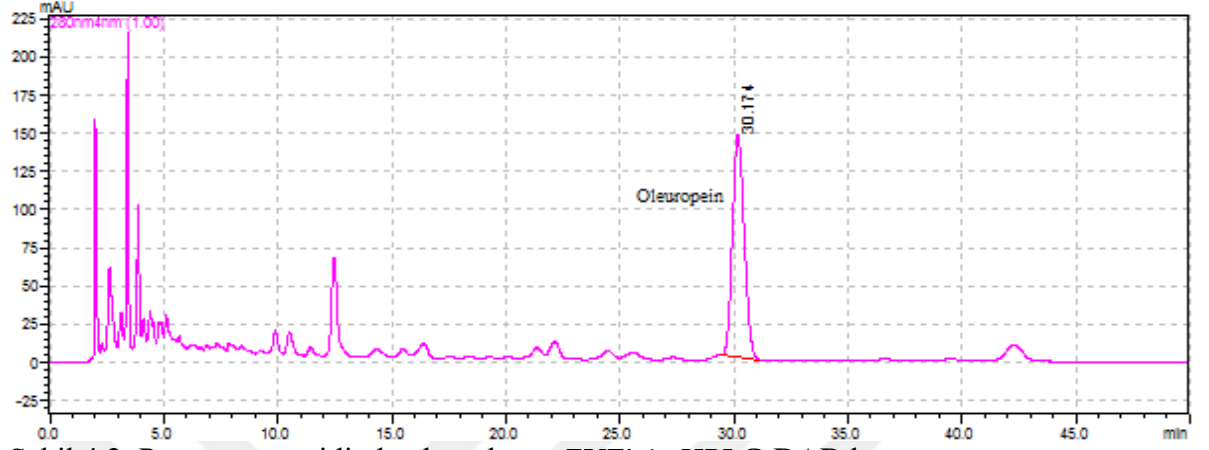
Fenolik bileşiklerin çeşitliliği ve bitkilerdeki farklı dağılımı, TPC için elde edilen farklı aralıkları açıklayabilmektedir (Silva et al., 2006). Ek olarak farklı bölgelerden hasat edilen yaprakların toplam fenol miktarındaki belirgin farklılık iklimsel şartlardan kaynaklı olabilmektedir (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012).

4.1.2. Zeytin Yaprakı Ekstraktlarının Oleuropein İçerikleri

Oleuropein başta olmak üzere ZYE'nin biyoaktif bileşenlerinin tanımlanmasında kullanılan izokratik HPLC yöntemi bitki ekstratlarının ve çeşitli endüstriyel ürünlerin rutin analizlerinde kullanılmaktadır (Lee-Huang ve ark., 2003; Savournin ve ark., 2001).

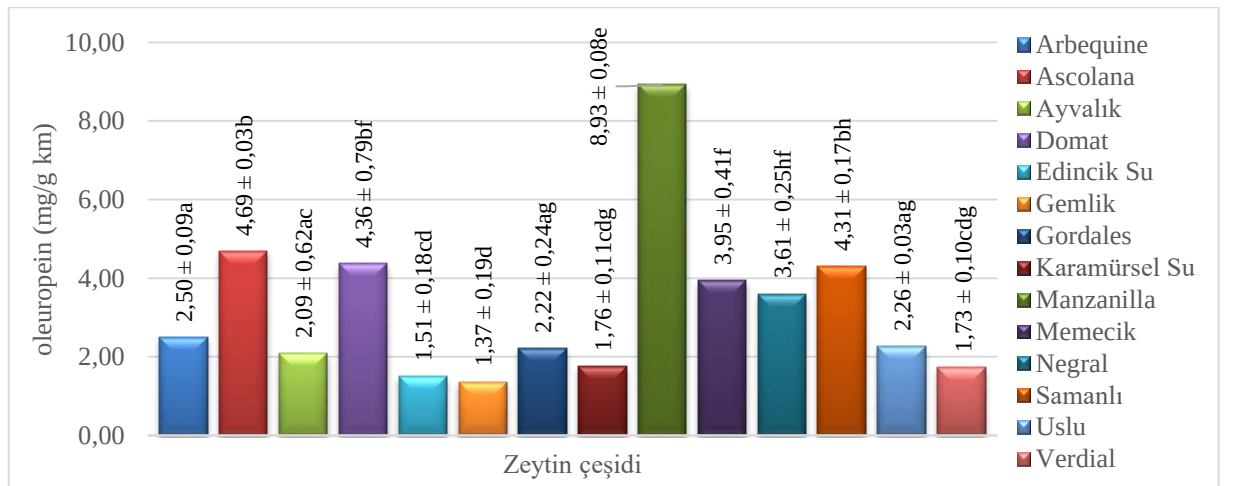
Zeytin yaprağından elde edilen ekstraktlarda oleuropeinin kantitatif analizi için

izokratik akış ile HPLC-DAD sistemi kullanılmıştır. HPLC analizinde 280 nm’de oleuropeine karşılık gelen pik saf oleuropein standardı kullanılarak tanımlanmış ve oleuropeinin farklı konsantrasyonlarıyla kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır.



Şekil 4.2. Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin HPLC-DAD kromatogramı

Peranzana örneğinin analizi sonucu elde edilen kromatogramda (Şekil 4.2) 280 nm’de oleuropeinin alıkonma zamanı 30,174 dakika olarak saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalara (Bouaziz ve ark., 2008; Erdoğan ve Turhan, 2011) benzer olarak ZYE’de oleuropeinin majör fenolik bileşenlerinden biri olduğu doğrulanmıştır. Bu veriler ekstraktın zengin bir oleuropein kaynağı olduğunu göstermektedir.

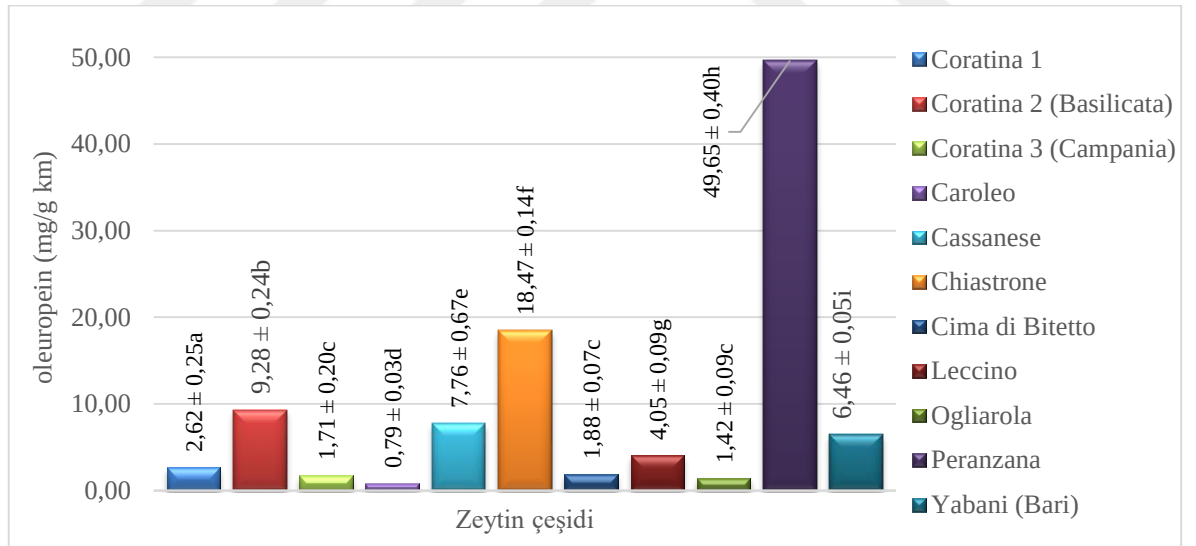


Şekil 4.3. Türkiye’den toplanan zeytin yapraklarından elde edilen ZYE’lerin HPLC-DAD yöntemiyle belirlenen oleuropein miktarı

Zeytin yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların oleuropein miktarı mg oleuropein/g km olarak Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Türkiye’den toplanan

yapraklardan elde edilen ZYE'lerde en yüksek oleuropein miktarı Manzanilla örneğinde belirlenmiştir ve oleuropein miktarı $8,93 \pm 0,08$ ile $1,37 \pm 0,19$ mg/g km aralığında değişmektedir. İtalya'dan toplanan yapraklardan elde edilen ZYE'ler için en yüksek oleuropein miktarı Peranzana ($49,65 \pm 0,40$ mg/g km) en düşük oleuropein miktarı ise Carolea ($0,79 \pm 0,00$ mg/g km) çeşidinden elde edilen ekstraktlarda belirlenmiştir.

Türkiye'den ve İtalya'dan toplanan örneklerin sonuçları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, analiz edilen ZYE'ler aynı çevresel (coğrafya, jeoloji, iklim) koşullara maruz kalan türlerden toplanmış olmasına rağmen örnekler arasında içsel farklılıklar mevcuttur. Ağaç üzerindeki durum, çeşit, güneş maruziyeti toprak ve mineral içeriği gibi birçok değişken zeytin ürünlerinin fenolik bileşik içeriğini etkileyebilir. Bununla birlikte, ağacın coğrafi yerinin zeytin ürünlerinin fenolik bileşen profili üzerinde en büyük etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Vinha ve ark., 2005). HPLC analizinde zeytin yaprağı fenolik bileşenlerinin, özellikle oleuropeinin, pik alanları, aynı coğrafi bölgedeki *Olea europea* zeytin ağaçlarının çeşitlerini ayırt etmek ve sınıflandırmak için kemo metrik modelleri oluşturmada kemo taksonomik işaretleyiciler olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012).



Şekil 4.4. İtalya'dan toplanan zeytin yapraklarından elde edilen ZYE'lerin HPLC-DAD yöntemiyle belirlenen oleuropein miktarı

Ranalli ve ark. (2006) tarafından HPLC ile analiz edilen yeşil zeytin yapraklarının oleuropein miktarı $2,24 \pm 0,20$ ile $8,55 \pm 0,71$ mg/g taze ağırlık aralığındadır. Çeşitli organik solventler ile ekstrakte edilen ve metanol içerisinde çözündürülen örneklerde Caroleo ve

Coratina çeşitleri için oleuropein miktarı sırasıyla $2,36 \pm 0,20$ ve $4,28 \pm 0,29$ mg/g taze ağırlık olarak belirlenmiştir. Genel olarak, genetik faktörlerin toplanan zeytin yapraklarında oleuropein içeriğini önemli ölçüde etkilediği vurgulanmıştır. Ben Salah ve Abdelmelek (2012) tarafından yapılan çalışmada ekstraktlarda en yüksek oleuropein miktarı $57,24 \pm 2,05$ mg/g km olarak belirlenmiştir. Metanol içerisinde hazırlanan ZYE'nin oleuropein miktarı $1151,50 \pm 57,20$ µg/mL olarak bildirilmiş ve diğer fenolik bileşenler ile kıyaslandığında en yüksek konsantrasyona sahiptir (Hayes ve ark., 2011).

Malik ve Bradford (2008), kurutulmuş yaprakların sıcak su ile ekstraksiyonunun oleuropeinin özümlemesi için etkili bir yöntem olduğunu belirtmiştir. Çeşitli çalışmalarda ZYE'nin ekstraksiyonu için çözgen olarak su kullanmış (Pereira ve ark., 2007; Silva ve ark., 2006) ve Corregiola ve Frantoio zeytin çeşitlerinden hazırlanan ZYE'ler için oleuropein miktarı sırasıyla $86,33 \pm 1,41$ ve $85,11 \pm 1,65$ µmol GAE/g km olarak bildirilmiştir (Goldsmith ve ark., 2015). Pereira ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada ise oleuropein miktarı $26,47 \pm 17,60$ mg/g liyofilize örnek olarak belirlenmiştir.

4.1.3. Zeytin Yapağı Ekstraktlarının Antioksidan Özellikleri

Zeytin yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların CUPRAC ve DPPH yöntemlerine göre antioksidan aktivite değerleri belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir.

CUPRAC yönteminde kromojenik oksitleyici ajan olarak bakır (II) ile neokuproin [Cu(II)-Nc] reaktifi reaksiyona girmekte ve bileşik Cu(I)-neokuproin'a dönüşmektedir (Al-rimawi ve ark., 2017). Bu yöntem, diğer elektron transferi tabanlı yöntemler üzerinde, fizyolojik pH'da çalışma pH'sının seçilebilmesi, hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilirliği, en yaygın flavonoidler için redoks reaksiyonlarının tamamlanması, gıda maddelerinde sıklıkla bulunan şekerleri ve sitrik asidi etkilemeden antioksidan bileşiklerin seçici oksidasyonu ve -SH taşıyan antioksidanları tayin edebilme kabiliyeti ile belirgin avantajlar sağlamaktadır (Apak ve ark., 2007). CUPRAC yöntemi meyve ve sebzelerdeki fenolik numunelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dai ve Mumper, 2010).

DPPH yöntemi, radikal olmayan DPPH-H'nin oluşumu nedeniyle hidrojen-verici antioksidan varlığında alkolik DPPH çözeltisinin indirgenmesine dayanmaktadır (Öztürk ve ark., 2007). Düşük konsantrasyonlarda bile aktif bileşenlere karşı yüksek duyarlılık sergilmesi ve analiz süresinin kısa olması gibi avantajlarıyla DPPH yöntemi bitki özlerinin serbest radikal süpürme kapasitesini değerlendirmede güvenilir bir araç olarak seçilmiştir.

Genel olarak DPPH radikal süpürme aktivitesinin ve antioksidan aktivitesinin fenolik bileşiklerin miktarından ve fenolik bileşiklerin hidrosilasyon derecesinden büyük oranda etkilendiği öngörülmektedir (Debib ve Boukhatem, 2017). IC₅₀, ortamda bulunan DPPH radikalının %50'sini inhibe edebilen ekstraktaki antioksidan bileşiklerin konsntrasyonunu göstermektedir. IC₅₀ değeri en düşük olan numune, daha yüksek bir antioksidan aktivite sunmaktadır.

Çizelge 4.3. Türkiye’den toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin CUPRAC ve DPPH yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri

Örnek	CUPRAC (mg TE/g km)	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)
1 Arbequine	14,10 ± 1,01ad	0,97 ± 0,18a
2 Ascolana	7,00 ± 1,50b	1,12 ± 0,05ab
3 Ayvalık	10,70 ± 1,63ab	0,91 ± 0,14ad
4 Domat	13,19 ± 0,77a	1,06 ± 0,01ab
5 Edincik Su	5,84 ± 1,31b	1,42 ± 0,05be
6 Gemlik	3,30 ± 2,12b	2,18 ± 0,05c
7 Gordales	8,72 ± 3,82ab	1,01 ± 0,04ab
8 Karamürsel Su	9,54 ± 0,42ab	1,25 ± 0,07abe
9 Manzanilla	24,53 ± 2,16ce	0,31 ± 0,36d
10 Memecik	14,84 ± 7,57d	0,85 ± 0,29af
11 Negral	9,35 ± 2,06ab	0,98 ± 0,02a
12 Samanlı	18,92 ± 1,85de	0,52 ± 0,20df
13 Uslu	6,76 ± 1,74b	1,13 ± 0,42ae
14 Verdial	4,31 ± 2,65b	1,47 ± 0,29e
±Std. Hata	19,57	0,14

Sonuçlar “Ortalama±SD”olarak verilmiştir (n=2).

Farklı küçük harflerle (a-f) gösterilen sütun değerleri birbirinden farklıdır (P< 0,05).

Türkiye’den toplanan yapraklardan elde edilen ZYE’lerde en yüksek CUPRAC değeri (24,53±2,16 mg TE/g km) Manzanilla örneğinde, en düşük CUPRAC değeri (3,30±2,12 mg TE/g km) ise Gemlik örneğinde belirlenmiştir. İtalya’dan toplanan yapraklardan elde edilen ZYE’ler için CUPRAC değerleri 162,86±7,85 mg TE/g km ile 41,51±2,35 mg TE/g km aralığına değişmektedir. En yüksek CUPRAC değeri Peranzana çeşidinden hazırlanan

ekstraktta, en düşük değer ise Coratina 3 çeşidinden hazırlanan ekstraktta belirlenmiştir.

DPPH yönteminde sonuçlar incelendiğinde Türkiye’den toplanan yapraklardan elde edilen ZYE’lerde en düşük IC₅₀ değeri 0,31±0,50 mg/mL ile Manzanilla çeşidinden hazırlanan ekstraktta, İtalya’dan toplanan yapraklardan elde edilen ZYE’lerde ise en düşük IC₅₀ değeri 0,29±0,02 mg/mL ile Peranzana çeşidinden hazırlanan ekstraktta belirlenmiştir. Bu çeşitlerden hazırlanan ZYE’ler için kendi grupları arasında IC₅₀ değerlerinin en düşük olması en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduklarının göstergesidir.

Çizelge 4.4. İtalya’dan toplanan zeytin yapraklarıyla hazırlanan ZYE’lerin CUPRAC ve DPPH yöntemine göre antioksidan aktivite değerleri

Örnek	CUPRAC (mg TE/g km)	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)
1 Coratina 1	91,10 ± 0,34a	0,50 ± 0,08a
2 Coratina 2 (Basilicata)	90,30 ± 3,22ac	0,38 ± 0,02bd
3 Coratina 3 (Campania)	41,51 ± 2,35b	0,89 ± 0,08c
4 Caroleo	49,08 ± 1,48b	0,93 ± 0,01c
5 Cassanese	83,06 ± 2,69ac	0,46 ± 0,05ab
6 Chiastrone	143,42 ± 6,17d	0,32 ± 0,04b
7 Cima di Bitetto	111,39 ± 2,70e	0,41 ± 0,04bdf
8 Leccino	96,42 ± 0,15a	0,46 ± 0,02ad
9 Ogliarola	62,79 ± 8,47f	0,65 ± 0,04e
10 Peranzana	162,86 ± 7,85g	0,29 ± 0,02b
11 Yabani (Bari)	81,08 ± 0,16c	0,50 ± 0,01af
±Std. Hata	3,05	0,3

Sonuçlar “Ortalama±SD”olarak verilmiştir (n=2).

Farklı küçük harflerle (a-g) gösterilen sütun değerleri birbirinden farklıdır (P< 0,05).

Analiz edilen örneklerin tümü değerlendirildiğinde CUPRAC sonuçları ile TPC (r=0,99, P<0,0001) ve TFC (r=0,92, P<0,0001) arasındaki oldukça yüksek pozitif korelasyonolduğu belirlenmiştir. DPPH ile TPC (r=-0,75, P<0,0001) ve TFC (r=-0,68, p<0,0001) arasında negatif yönlü korelasyon belirlenmiştir.

ZYE'deki fenolik hidroksil bileşiklerinin antioksidan aktivitesi, oleuropein, hidroksitirosol ve luteolin-7-0-glikozit asit gibi yapılarının hidroksil gruplarının varlığına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Benavente-García ve ark., 2000). ZYE'nin güçlü antioksidan

aktivitesi, en etkili antioksidatif bileşenlerden biri olduğu bildirilmiş olan polifenollerin yüksek miktarıyla ilişkilendirilmiştir (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012; Velioglu ve ark., 1998). Yüksek oleuropein varlığı bazı çeşitler için yüksek antiradikal aktiviteye karşılık gelmesine rağmen, oleuropein içeriği ve antiradikal aktivite arasında her zaman pozitif bir korelasyon gözlenememektedir (Ben Salah ve Abdelmelek, 2012).

Sulu ekstraksiyon ile hazırlanan ZYE'lerin CUPRAC değerleri Corregiola çeşidi için $308,65 \pm 36,83$ mg TE/g km (Goldsmith ve ark., 2015) ve $121,97 \pm 5,45$ mg TE/g km (Goldsmith ve ark., 2014) olarak belirlenmiştir. Frantoio çeşidi için ise CUPRAC değeri $318,07 \pm 59,76$ mg TE/g km'dir (Goldsmith ve ark., 2015).

Khaliq ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada sıcak su ile ekstraksiyonu ile elde edilen ZYE'ler için en düşük IC_{50} değeri $22,46 \mu\text{g/mL}$, en yüksek IC_{50} değeri ise Coratina çeşidinden elde edilen ZYE için $198 \mu\text{g/mL}$ 'dir. İncelenen diğer çeşitler için Uslu ve Gemlik çeşidinden elde edilen ZYE'ler için IC_{50} değerleri sırasıyla $115,5 \mu\text{g/mL}$ ve $23,5 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Metanolik ekstraksiyon ile hazırlanan ZYE'lerin antioksidan kapasiteleri (IC_{50}) değerleri $659,98 \pm 0,92$ ile $1119,59 \pm 12,24 \mu\text{g/mL}$ arasında değişmektedir (Mahmoudi ve ark., 2016).

4.2. ZYE Yüklü ve Boş Niozomların Karakterizasyonu

Düşük maliyet, daha fazla stabilite ve iyonik olmayan veziküllerin depolama kolaylığı (Uchegbu ve Vyas, 1998) çeşitli ilaçların ve biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımının artırılması için niozomların fosfolipit veziküllere alternatif olarak kullanımına neden olmuştur (Balakrishnan ve ark., 2009).

ZYE yüklü niozomların ve boş niozomların hazırlanmasında film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır. Birçok çalışmada (Balakrishnan ve ark., 2009; Hao ve ark., 2002) optimum enkapsülasyon verimini veren 1:1 (w/w) span 60:kolesterol oranı kullanılarak steril koşullar altında MLV'ler hazırlanmıştır (Şekil 4.5).

Formülasyonda kullanılan yüzey aktif maddenin HLB değeri 10'un üzerine çıktıkça, vezikülleri oluşturmak için gerekli minimum kolesterol miktarı artmaktadır (Uchegbu ve Vyas, 1998). Kolesterol kullanılmadan hazırlanan formülasyonlarda niozomların jelimsi bir yapı oluşturduğu, varlığında ise niozom dağılımının elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca, Span 60'ın (HLB 4,7) yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip olması nedeniyle Span 20 ile karşılaştırıldığında daha yüksek enkapsülasyon verimi sağlamıştır (Yoshioka ve ark., 1994). Niozomların hazırlanmasında yüzey aktif madde ile kolesterol ve diğer katkı maddelerinin kullanım oranları önemli olduğu gibi formülasyona eklenen etken maddenin toplam lipitler ile oranı da oldukça önemlidir. Niozomların çeşitli etken maddelerin çözünürlüğünü

arttırabileceği ancak ilaç konsatrasyondaki artışın belirli bir orandan sonra çökmelere neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Mokhtar ve ark., 2008).

Hazırlanan niozomların karakterizasyonu için enkapsülasyon verimi, veziküllerin ortalama boyutları ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Boş ve ZYE yüklü kapsüllerin morfolojik yapının incelenmesi için ışık mikroskobu, SEM ve TEM kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Boş ve ZYE yüklü niozomların görünümü

Niozom formülasyonlarının enkapsülasyon verimi, ilaç dağıtım sistemlerindeki potansiyel kullanımı ile farmasötik açıdan en önemli parametredir. Kapsülleme verimi aynı zamanda kapsüllemeyen etken maddenin uzaklaştırılması için zaman ve uygulanması gereken ek işlemler anlamına gelmektedir (Balakrishnan ve ark., 2009; Hao ve ark., 2002). Lipit veziküllerinde suda çözünür moleküllerin kapsüllemesini etkileyen temel faktör, biyomoleküler membranların geçirgenliği ve çift tabakalı yüzey aktif maddenin hidrokarbon zincirinin yapısal özelliğidir. Span 60, normal ortam koşullarında yarı katı jel durumunda olan doymuş açıl zincirlerine sahip olmasından dolayı veziküller suda çözünür ilaç moleküllerini daha az sızdırmaktadır (Abdelkader ve ark., 2010).

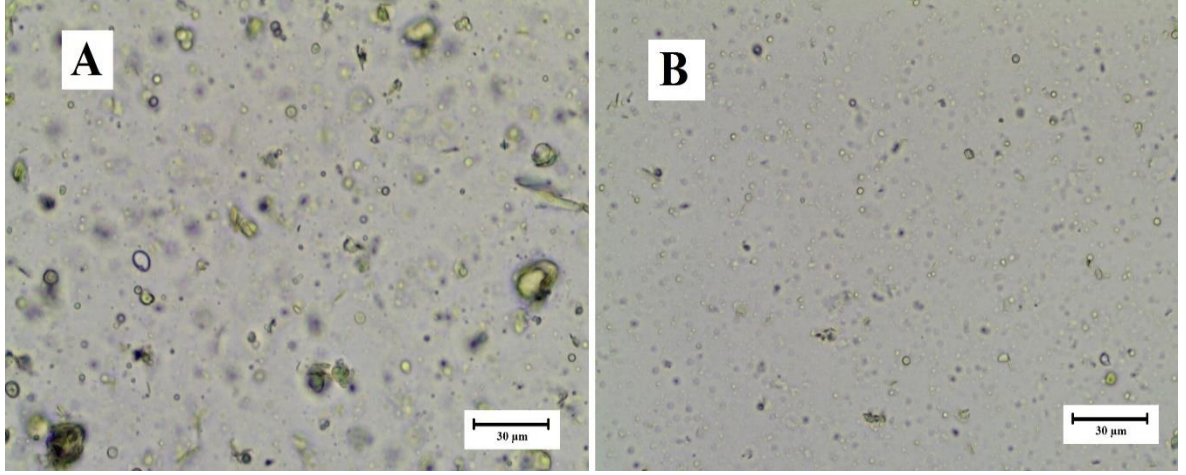
Kapsüllemeyen ZYE, hızlı ve ucuz bir yöntem olan soğuk santrifüj (4°C, 15.000 rpm, 30 dakika) ile ayrılmıştır. En uzun doymuş alkil zincirine sahip Span 60 kullanılarak hazırlanan veziküllerin enkapsülasyon verimi kapsüllemeyen etken madde uzaklaştırılarak hesaplanmıştır. 1:1:1 (w/w) Span 60:kolesterol:liyofilize ZYE formülasyonu için enkapsülasyon verimi $41,92 \pm 0,81$ olarak belirlenmiştir.

İlaç dağıtım sistemlerinde partikül boyutu, enkapsülasyon verimi ve etken madde salınımını etkileyebilecek önemli bir faktördür. Buna ek olarak, yüzey aktif maddenin HLB değeri ve zincir uzunluğu da veziküllerin partikül boyutunu etkileyebilir. Film hidrasyon

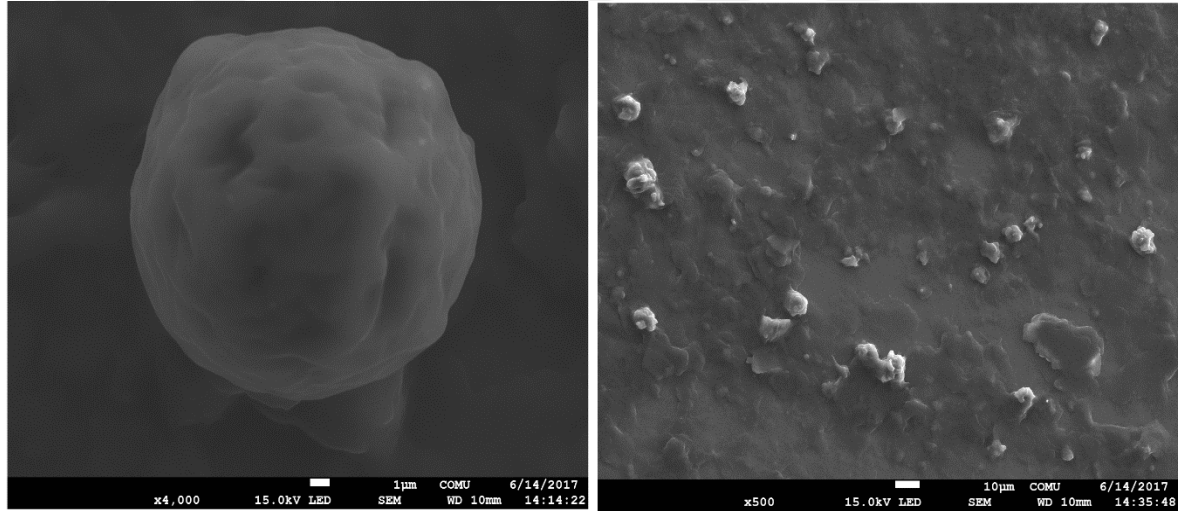
yöntemi ile hazırlanan MLV'lerin boyutlarının küçültülmesi amacıyla ultrases uygulanmıştır. Hazırlanan ZYE yüklü ve boş veziküllerin ortalama büyüklükleri sırasıyla $2,66 \pm 1,25 \mu\text{m}$ ve $2,37 \pm 1,41 \mu\text{m}$ 'dir. Veziküllerin büyüklüğü, çift tabakadaki moleküllerin özelliklerine ve çift katmanlar arası etkileşime bağlı olduğu düşünülmektedir. Veziküllerin nihai büyüklüğü, çift katmanlar arasındaki mesafe ve mevcut yapıdaki çift katman ile değişmektedir (Balakrishnan ve ark., 2009; Hao ve ark., 2002). Ayrıca, vezikül çapının yüzey aktif maddelerin alkil zincirinin uzunluğuna bağlı olduğu bilinmektedir. Daha uzun alkil zincirli yüzey aktif maddeler genellikle daha büyük veziküller vermektedir (Uchegbu ve Vyas, 1998). Niozomların mikro boyutlarda olması Span 60'ın alkil zincirinin uzun olmasıyla da ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde, Aswathy ve John (2014) tarafından hazırlanan niozomların boyutları $2,58 \mu\text{m}$ ile $3,13 \mu\text{m}$ arasında bulunmuştur.

ZYE yüklü ve boş non iyonik veziküllerin zeta potansiyelleri sırasıyla $-34,16 \pm 6,48 \text{ mV}$ ve $-70,68 \pm 4,75 \text{ mV}$ olarak ölçülmüştür. Vezikül yüzeyindeki yükler veziküller arası itici bir güç üreterek homojen dağılım sergileyen bir dispersiyon oluşumunu sağlamaktadır. 30 mV 'nin üzerinde (Pozitif veya negatif) belirlenen değerler elektrostatik stabilite için yeterince yüksektir ve kararlı bir dispersiyon elde edildiği söylenebilir. Zeta potansiyelinin büyüklüğü veziküllerin stabilitesinin bir göstergesidir. Patel ve ark. (2014) tarafından antimikrobiyal etkinliğin iyileştirilmesi amacıyla yapılan çalışmada propolisin yüklü ve boş niozomların zeta potansiyelleri sırasıyla $-33,2 \text{ mV}$ ve $-38,8 \text{ mV}$ olarak belirlenmiştir. Askorbil palmitat, kolesterol ve diasetil fosfat kullanılarak, film hidrasyon yöntemiyle zidovudin yüklü veziküller üretilmiştir. Farklı formülasyonlarla hazırlanan veziküllerin zeta potansiyelleri $-42,9 \pm 0,5 \text{ mV}$ ve $-76,3 \pm 2,6 \text{ mV}$ aralığındadır (Gopinath ve ark., 2004).

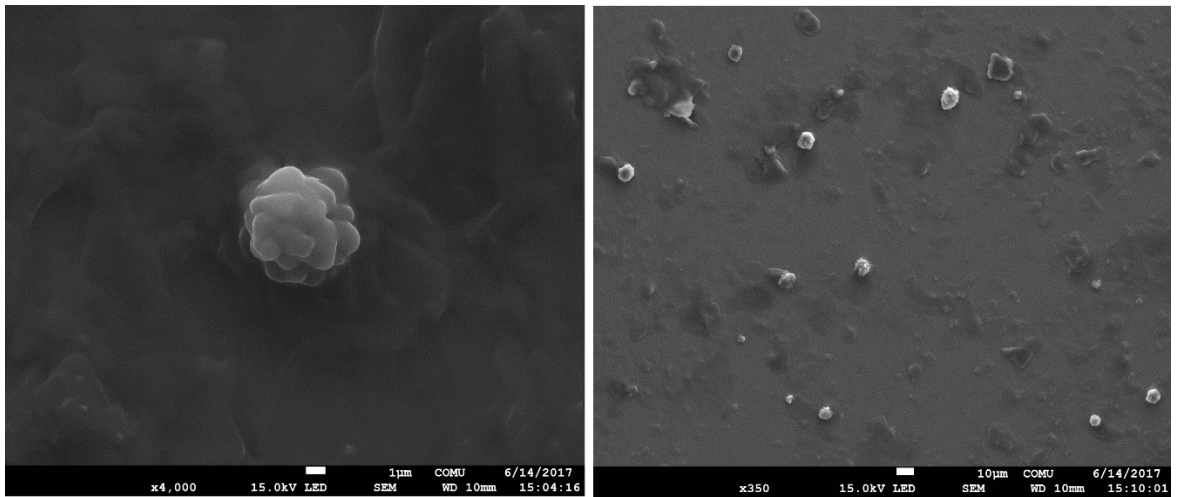
Işık mikroskobu (Şekil 4.6), SEM (Şekil 4.7 ve 4.8) ve TEM (Şekil 4.9) görüntüleri yeni hazırlanmış niozomal dispersiyonların fotoğrafını göstermektedir. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere, olgunlaşma sonrasında farklı şekil ve boyutlarda niozomlar görülmektedir. Ultrases uygulamasıyla boyutlandırma sonrası vezikül büyüklükleri belirgin bir şekilde küçülmüştür ve veziküllerin dağılımı ise daha homojen olmuştur. SEM görüntülerine (Şekil 4.7 ve 4.8) göre, boş ve ZYE yüklü niozomlar küresel yapıdadır. Boş ve ZYE yüklü niozomların TEM mikrografileri (Şekil 4.9) incelendiğinde ise homojen dağılmış veziküller elde edildiği görülmektedir. Bununla birlikte, boş niozomların şekilleri genel olarak küre şeklinde iken ZYE yüklü niozomlarda farklı şekiller gözlemlenmiştir.



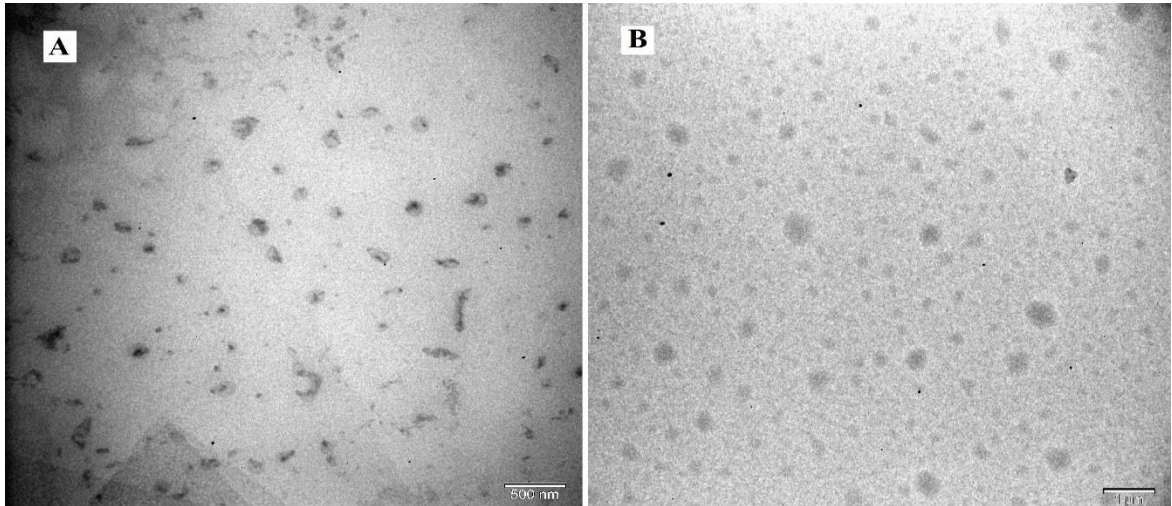
Şekil 4.6. Olgunlaşma sonrası (A) ZYE yüklü niozom (40x) ve Boyutlandırma sonrası (B) ZYE yüklü niozom (10x)



Şekil 4.7. ZYE yüklü niozomların SEM görüntüsü



Şekil 4.8. Boş niozomların SEM görüntüsü



Şekil 4.9. ZYE yüklü (A) ve boş (B) niozomların TEM görüntüsü

4.3. ZYE ve ZYE Yüklü Veziküllerin Antimikrobiyal Aktivitesi

4.3.1. ZYE'nin Antimikrobiyal Aktivitesi

Geniş spektrumlu etkinliği bulunan antimikrobiyal ajanlar, hem ilaç hem de gıda endüstrisinin önceliğini oluşturmaktadır. Sentetik ilaçlara karşı direnç artışını kontrol edebilmek amacıyla terapötik etkili bitkiler patojenik bakterilere karşı test edilmektedir. Bu nedenle, bitki bazlı antimikrobiyal ajanların kullanımı çeşitli bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Hussain ve ark., 2014). Terapötik etkili nutrasotikler, geleneksel gıda muhafaza yaklaşımlarının değiştirilmesini kolaylaştırmak için tek başlarına veya engel yaklaşımı kapsamında yeni muhafaza teknolojileri ile birlikte kullanılabilir (Tiwari ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalarda, çok çeşitli fenolik ekstraktların antimikrobiyal etkileri rapor edilmiş olsa da, bu ürünlerin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Fenolik bileşiklerin antibakteriyel aktivitesinin, protein, glutamat, potasyum ve fosfat gibi yapısal bütünlüğün ve hücre içi sitoplazmik bileşenlerin sızıntısına neden olan hücre çeperi peptidoglikanın bozulmasına ve bakteri membranı hasarına bağlı olabileceğine inanılmaktadır (Caturla ve ark., 2015). Fenolik bileşiklerdeki hidroksil grubu, enzimlerin aktif yerlerini bağlayabilmekte ve substratın affinitesini değiştirebilmektedir. Ek olarak, lipid çözünürlüğü ve sterik engel derecesi antimikrobiyal aktiviteye katkıda bulunabilir (Janakat ve ark., 2015). Bisignano ve ark. (1999), zeytinyağının fenolik bileşiklerinin antibakteriyel aktivitesinin, orto-difenolik sistemin (katekol) varlığına bağlı olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, fenol grubundaki hidroksil gruplarının konumu ve sayısı, artan hidroksilasyonun

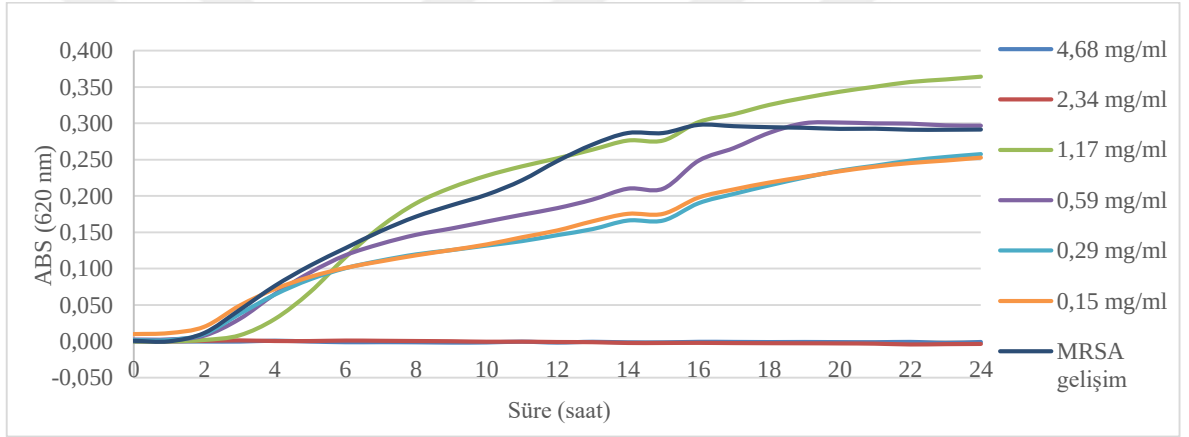
antimikrobiyal aktivitenin artmasına neden olmasıyla, mikroorganizmalara karşı göreceli toksisiteyle ilişkilendirilmiştir (Cowan, 1999). Pereira ve ark. (2007) tarafından ise ZYE'nin antimikrobiyal mekanizması için proteinleri denatüre ettiği ve hücre zarı geçirgenliğini etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca, tek başına biyoaktif bir bileşen, ekstraktlarda bulunan diğer bileşenlerin varlığında özelliklerini değiştirebildiği için ekstraktlar, izole edilmiş bileşenlerden daha fazla antimikrobiyal etki gösterebilmektedir.

Bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testleri için çeşitli yöntemler mevcuttur. Genel olarak MİK değerinin belirlenmesinde dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır (Alexander ve Warnick, 2009; Patel ve ark., 2014). Dilüsyon duyarlılık test yöntemleri, agarda veya broth ortamda (makrodilüsyon veya mikrodilüsyon) bir mikroorganizmayı inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan antimikrobiyal maddenin minimum konsantrasyonunu yani MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerini belirlemek için en uygun yöntemlerdir. Broth mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobiyal duyarlılık testi için standartlaşmış referans bir yöntemdir. MİK değerinin belirlenmesi amacıyla bu testin kolaylıkla yapılabilmesi, küçük ölçeklerde uygulanabilmesi, kullanılan reaktif miktarlarının az olması, ticari olarak hazırlanmış, dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş tek kullanımlık panellerin kullanılabilmesi ve tekrarlanabilirliği gibi avantajlarından dolayı mikrodilüsyon tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (Jorgensen ve Ferraro, 2009; Turnidge ve Paterson, 2007). Antimikrobiyal maddeler genellikle log₂ (iki katlı) seri seyreltmeler ile test edilmekte ve kullanılan konsantrasyon aralığı antimikrobiyal madde ile birlikte test edilen organizmaya göre değişebilmektedir. Broth ve agar dilüsyon yöntemleri bakteri ve küflere karşı in vitro antimikrobiyal aktiviteyi nicel olarak ölçmek için kullanılmaktadır (Balouiri ve ark., 2016).

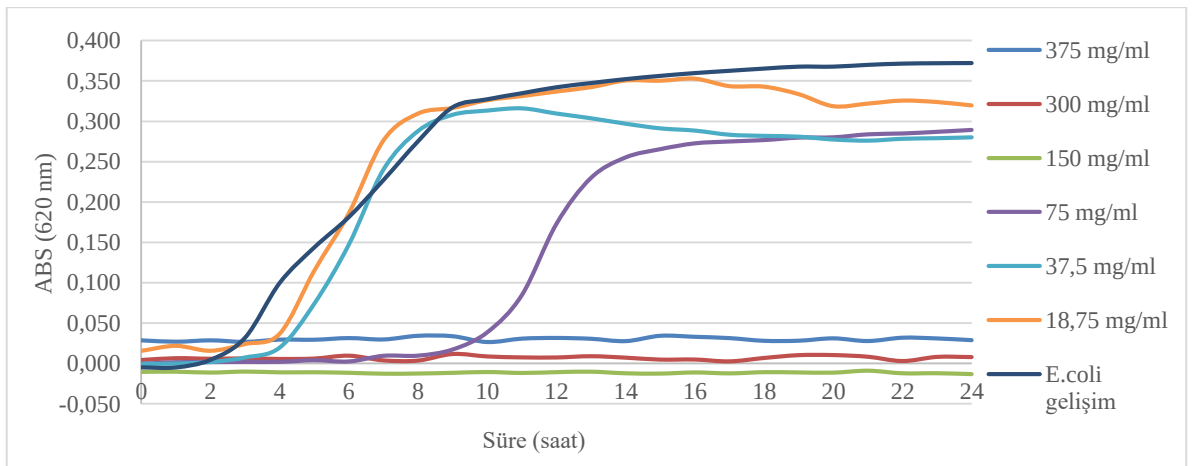
Bu çalışmada, mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası kullanılarak, MHB (Mueller-Hinton Broth) besiyerinde *E.coli*, *L. innocua*, *S. typhimurium* ve MRSA'ya karşı ZYE, ZYE yüklü kapsül ve boş kapsüllerin uygun seyreltileri hazırlanarak MİK değerleri belirlenmiştir. MHB, çoğu patojenin büyümesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır ve yaygın bir şekilde izole edilen, hızlıca büyüyen aerobik veya fakültatif organizmaların duyarlılık testi için iyi bir besiyeridir. Broth dilüsyon testleri için tavsiye edildiği üzere, son inokulum konsantrasyonu 5x10⁵ CFU/mL olarak ayarlanmıştır. Mikroorganizmalar gelişimlerini detekleyici MHB'a aktarılmış ve bulanıklık gözlemlenene kadar inkübasyona devam edilmiştir. İnokülümün büyüklüğündeki değişiklikler MİK değerini önemli ölçüde etkileyebildiği için inokülüm standardizasyonuna dikkat edilmiştir.

ZYE, ZYE yüklü ve boş niozomların, 2 adet olmak üzere gram pozitif (MRSA ve *L. innocua*) ve gram negatif (*E. coli* ve *S. typhimurium*) mikroorganizmalara karşı MİK

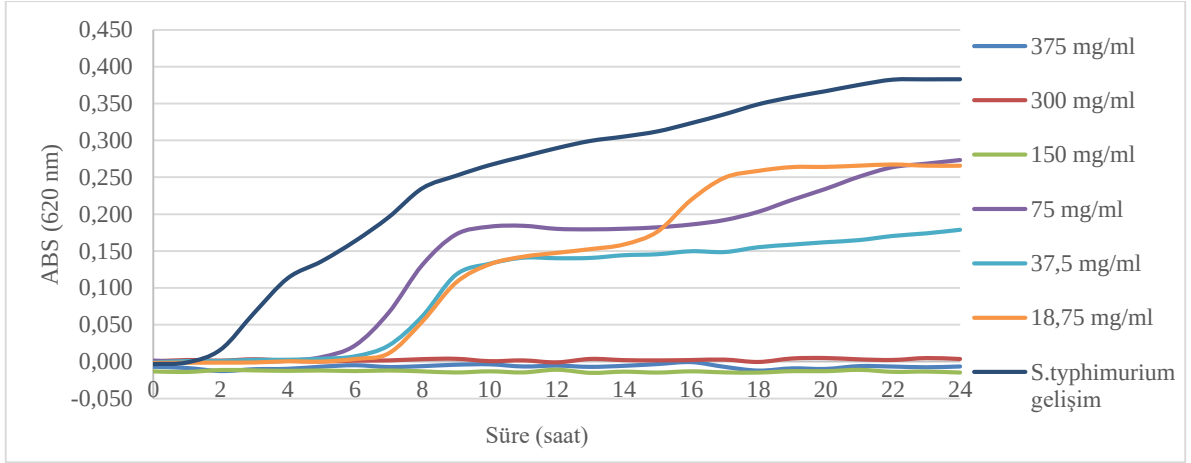
değerlerinin belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13’de sırasıyla MRSA, *E. coli*, *S. typhimurium* ve *L. innocua* mikroorganizmalarına ilişkin mikrobiyal gelişim eğrileri görülmektedir. ZYE’nin MİK değeri MRSA için 2,34 mg/mL (70,6 µg oleuropein içermekte), *E. coli*, *S. typhimurium* ve *L. innocua* mikroorganizmaları için ise 150 mg/mL (3,38 mg oleuropein içermekte) olarak belirlenmiştir. Inokülüm gelişimi ile kıyaslandığında MRSA için 2,34 mg/mL’den, *E. coli* ve *S. typhimurium* için ise 150 mg/mL’den düşük konsantrasyonlarda mikroorganizmaların gelişimleri yavaşlamış ama tam olarak durmamıştır. Bu sonuçların aksine *L. innocua* için 150 mg/mL’den daha düşük konsantrasyonlar mikroorganizmanın gelişimini pozitif yönde etkilemiştir ve dolayısıyla bu konsantrasyonlardaki gelişimlerin inokülümün normal gelişiminden çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



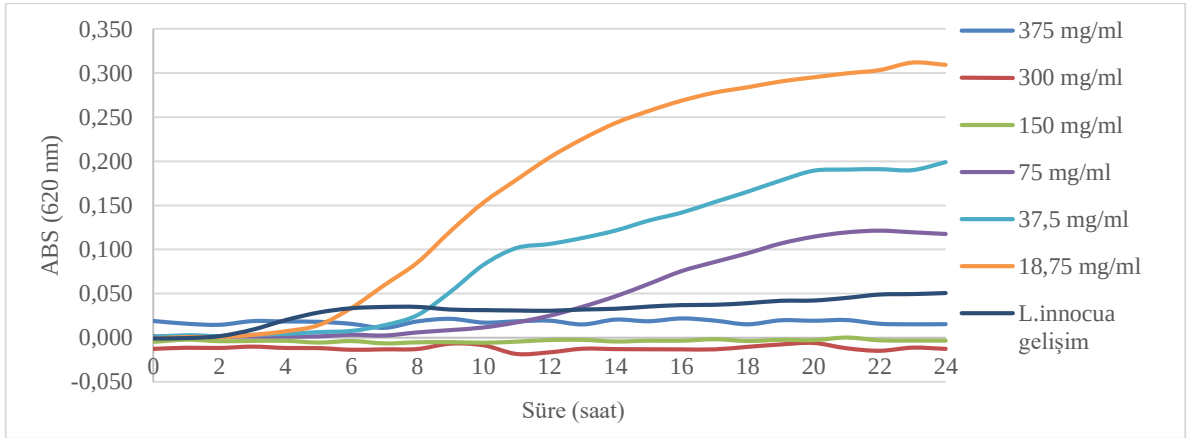
Şekil 4.10. MRSA'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MİK değeri



Şekil 4.11. *E. coli*'ye karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MİK değeri



Şekil 4.12. *S.typhimurium* 'a karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MİK değeri



Şekil 4.13. *L.innocua* 'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE'nin MİK değeri

MIK değerlerine göre ZYE'ye en duyarlı mikroorganizma MRSA'dır. Mikrodilüsyon yönteminin doğrulanması amacıyla geleneksel yöntem kullanılarak toplam canlı sayımı yapılmış ve belirlenen MİK değerlerinde herhangi bir mikrobiyal gelişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.5).

Casas-Sanchez ve ark. (2007) oleuropeine karşı gram-negatif bakterilerin gram-pozitif bakterilere göre daha dirençli olduğunu bildirmiştir. Bu durum gram-negatif bakterilerin dış hücre (duvar) membranına sahip olması ve gram-pozitif bakterilerde bu membranın olmamasıyla direncin düşmesi olarak açıklanabilir. Ayrıca bakteri zarları polifenollerin hidrofobik bileşenleri ile etkileşime girdiğinden dolayı gram-pozitif bakteriler polifenollere karşı daha duyarlıdır (Calo ve ark., 2015). Çalışmada gram-negatif olan MRSA'ya karşı ZYE'nin MİK değeri gram pozitiflere göre oldukça düşüktür. Ancak gram-negatif olan *L. innocua* karşı belirlenen MİK değeri gram pozitif bakteriler için belirlenen ile aynıdır.

Çizelge 4.5. Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE, ZYE yüklenmiş ve boş kapsülün seçilmiş gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteleri (18 saat, 37°C)

Mikroorganizma	Örnek	Kapsül	t ₀	Kontrol t ₁₈	t ₁₈	Değişim**
		(mg/mL)	(log ₁₀ CFU/mL)	(log ₁₀ CFU/mL)	(log ₁₀ CFU/mL)	(log ₁₀ CFU/mL)
MRSA	ZYE*	2,34	6,02±0,03	9,17±0,09	≤ 1 CFU/mL	-9,17
		50	5,89±0,05	9,17±0,09	8,75±0,10	-0,42
	Kapsül	100	5,87±0,05	9,17±0,09	5,57±0,09	-3,6
		150	5,99±0,01	9,17±0,09	≤ 1 CFU/mL	-9,17
		50	6,09±0,08	9,17±0,09	8,91±0,07	-0,26
	Boş kapsül	100	5,93±0,03	9,17±0,09	8,98±0,07	-0,19
		150	5,93±0,03	9,17±0,09	9,15±0,11	-0,02
<i>E. coli</i>	ZYE*	150	5,37±0,07	9,01±0,15	≤ 1 CFU/mL	-9,01
	Kapsül	150	5,65±0,05	9,01±0,15	9,02±0,09	0,01
	Boş kapsül	150	5,61±0,02	9,01±0,15	9,03±0,11	0,02
<i>S. typhimurium</i>	ZYE*	150	5,81±0,08	9,24±0,05	≤ 1 CFU/mL	-9,24
	Kapsül	150	6,24±0,01	9,24±0,05	9,19±0,06	-0,05
	Boş kapsül	150	6,49±0,07	9,24±0,05	9,28±0,06	0,04
<i>L. innocua</i>	ZYE*	150	6,50±0,06	7,65±0,07	≤ 1 CFU/mL	-7,65
	Kapsül	150	6,49±0,14	7,65±0,07	8,23±0,08	0,58
	Boş kapsül	150	6,64±0,13	7,65±0,07	7,21±0,24	-0,44

Değerler ortalama ± SD (n = 2) olarak ifade edilmiştir.

Tespit seviyesi ≤ 1 CFU/mL= Bakteri hücreleri tespit edilemedi ve 37 ° C'de 18 saatlik büyüme gözlenmemiştir.

*Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE

**18 saat sonra fark. - kontrol ile karşılaştırıldığında canlılıkta azalma, + kontrol ile kıyaslandığında canlılıkta artma.

Dada (2013) tarafından yapılan çalışmada zeytin yaprağının sulu ekstraktlarında MIK değeri *E. coli* ve *S. aureus* için sırasıyla 25 mg/mL ve 12,5 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Sulu ZYE'nin antimikrobiyal aktivitesi çeşitli bakterilere (*S. aureus*, *E. coli* ve diğerleri) ve mantarlara karşı test edilmiştir. ZYE'nin konsantrasyonu artarken *S. aureus* ve *E. coli*'nin büyüme hızlarının düştüğü ve ZYE'nin *S. aureus* ve *E. coli* için sırasıyla 2,68 ve 1,81 mg/mL IC₂₅ (%25 inhibisyon konsantrasyonu) değeri sergilediği rapor edilmiştir. ZYE konsantrasyonunun 0,05 mg/mL'den 5 mg/mL'ye artmasının, ZYE eklenmiş *S. aureus* ve *E.*

coli çeşitlerinin optik yoğunluklarında belirgin bir düşüşe (sırasıyla sırasıyla %51 ve %46) neden olduğu bildirilmiştir (Pereira ve ark., 2007)

Markin ve arkadaşları tarafından 2003’de *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*’ye karşı zeytin yaprağının sulu ekstraktı için MİK değerleri araştırmıştır. ZYE’nin MİK değeri *S. aureus* ve *E. coli* için 6 mg/mL olarak tanımlanmış ve 2 saat içinde *S. aureus*’un tamamen tahrip olduğu gözlemiştir. Ayrıca ZYE’nin konsantrasyonunun 3 mg/mL’den 6 mg/mL’ye çıkartılması, inhibisyon süresini *E. coli* için 24 saatten 3 saate düşürmüştür (Erdohan ve Turhan, 2011).

Korukluoğlu ve ark. (2010) ekstraksiyon solventinin *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* ve diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal etkinliği üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çözücü tipinin ekstraktlardaki fenolik dağılımı ve konsantrasyonları etkilediği ve test edilen bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteyi etkilediği bildirilmiştir. Sulu ekstraktların herhangi bir mikroorganizmaya karşı karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olmadığı rapor edilmiştir.

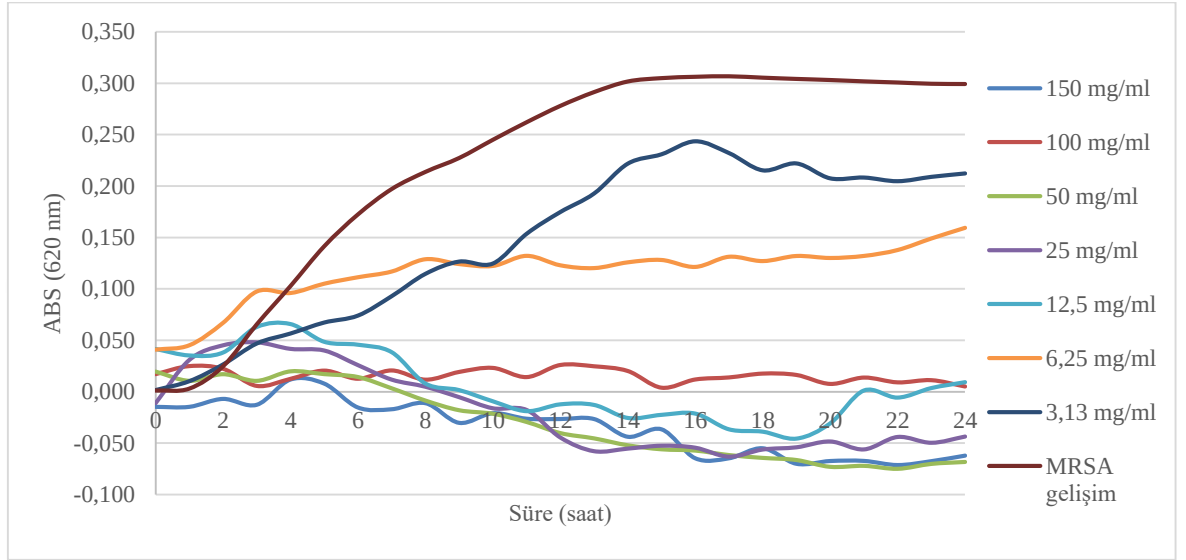
Zeytin yapraklarının farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerindeki gözlenen farklılıklar, ürünün orijini, yetiştirme koşulları, hasat zamanı, iklim koşulları, ekstrakttaki antimikrobiyal maddelerin dağılımı ve miktarı, numune hazırlama yöntemleri ile ilişkilidir (Ranalli ve ark., 2006). Bununla birlikte, gıda üzerinde doğal bitki ekstraktlarının veya uçucu yağların kullanılmasında aynı bileşiklerin in vitro çalışmalardan elde edilen sonuçları için her zaman tekrarlanabilir olmayabilir çünkü gıdalar, farklı ve bağlı mikro ortamlardan oluşan karmaşık, çok bileşenli sistemlerdir (Tiwari ve ark., 2009).

4.3.2. ZYE Yüklü ve Boş Niozomların Antimikrobiyal Aktivitesi

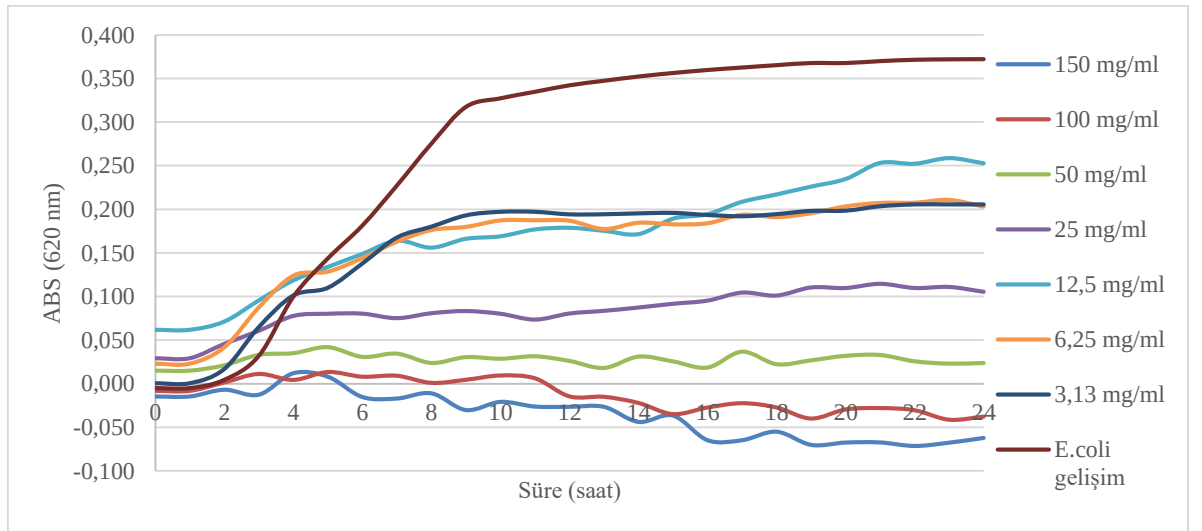
E.coli, *L. innocua*, *S. typhimurium* ve MRSA’ya karşı ZYE yüklü ve boş kapsülün MİK değerinin belirlenmesinde 3,13 mg/mL ile 150 mg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır (Şekil 4.14-4.17 ve 4.18-4.21, sırasıyla).

Şekil 4.15-4.17 incelendiğinde *E.coli*, *S. typhimurium* ve *L. innocua* için ZYE yüklü kapsüllerin MİK değerlerinin 150 mg/mL’den küçük olduğu görülmektedir. Buna karşın, Tablo 4.5’te verilen mikrodilüsyon yönteminin doğrulanması için yapılan toplam canlı sayımı sonuçlarına göre ise ZYE yüklü kapsülün 150 mg/mL’inde bu patojenler için herhangi bir inhibisyon gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla, mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen grafiklerdeki sapmaların, spektrofotometrik olarak analiz edilen örneklerin süt benzeri renginden ve niozom örneklerinin yüksek konsantrasyonlarda hazırlanmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Abdelaziz ve ark. (2014) tarafından yapılan

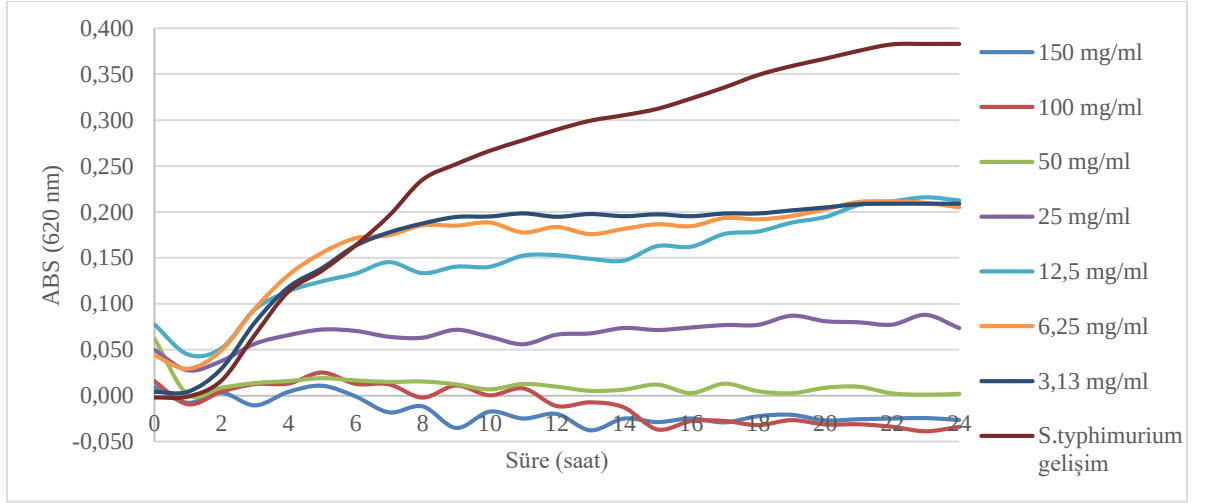
çalışmada norfloksasin yüklü niozomlar hazırlanmış ve antimikrobiyal etkinlik değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa* test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Niozom formülasyonlarının süte benzer görüntüsünden dolayı CLSI onaylı mikrotitre seri seyreltme yönteminde, bakteriyel gelişim varlığında maviden pembeye dönen renk indikatörü resazurin kullanılmıştır.



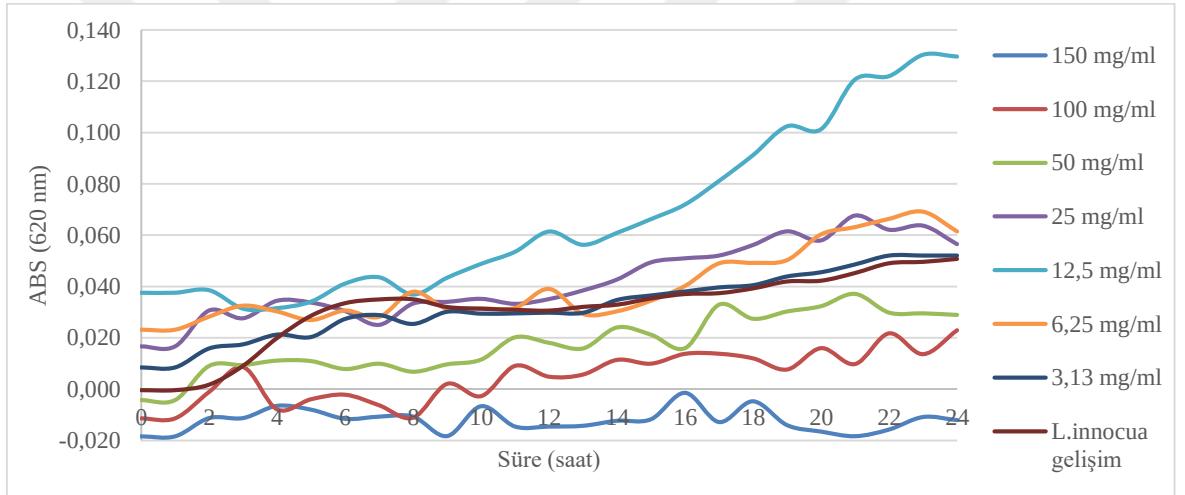
Şekil 4.14. MRSA'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri



Şekil 4.15. *E.coli* 'ye karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri



Şekil 4.16. *S.typhimurium*'a karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri



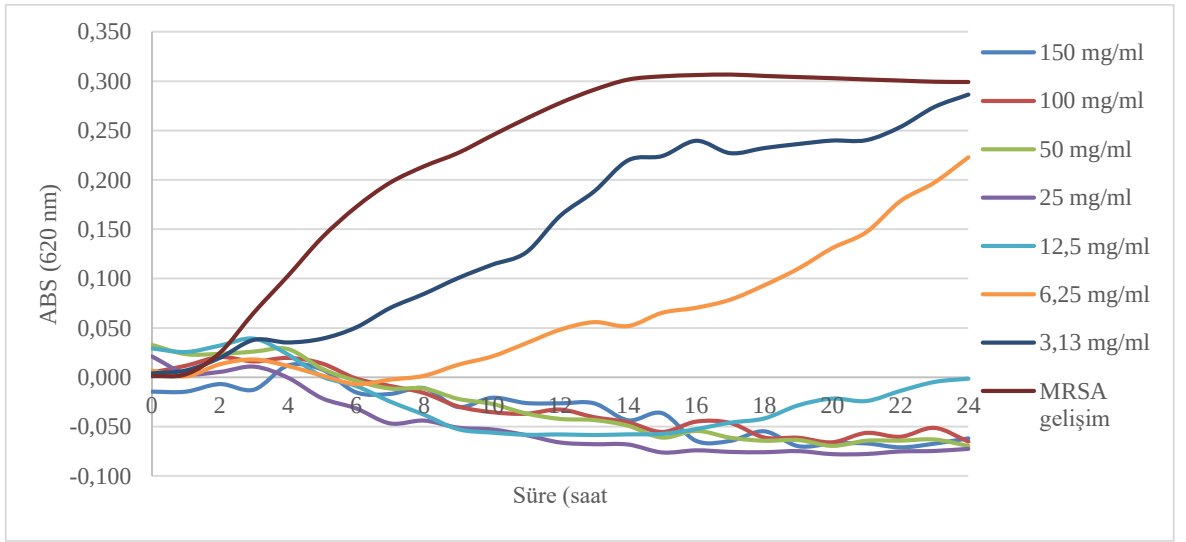
Şekil 4.17. *L.innocua*'ya karşı Peranzana çeşidinden hazırlanan ZYE yüklü kapsülün MİK değeri

E.coli ve *S. typhimurium* için ZYE yüklü kapsülün 18. saatte toplam canlı sayımı ile kontrolün 18. saatteki sayımları arasındaki fark (Çizelge 4.5), istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0,05$). *L. innocua* için ise ZYE yüklü kapsülün 150 mg/mL'si mikroorganizmanın gelişimini 0,58 log arttırmıştır ($p<0,005$). Kapsüllenen ZYE, *L. innocua*'nın inhibisyonu için yeterli olmadığı gibi mikroorganizmanın gelişimini olumlu yönde etkilemiştir. ZYE'nin 150 mg/mL'den düşük konsantrasyonlarında (Şekil 4.13) *L. innocua*'nın gelişimi hızlanmıştır ve kapsül için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

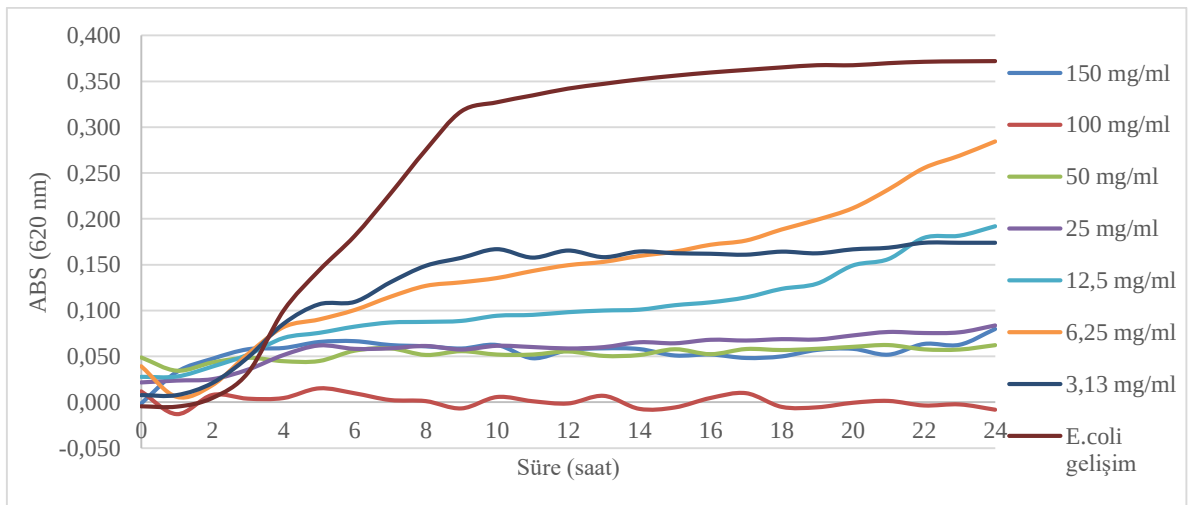
Çizelge 4.5'de gösterildiği üzere MRSA sayısında, ZYE yüklü kapsülün 50 mg/mL'sinde 0,42 log, 100 mg/mL'sinde ise 3,6 log azalma belirlenmiştir ($p<0,0001$). ZYE

yüklü kapsülün 150 mg/mL'sinde ise 9,12 log düşüşle MRSA'da gelişim gözlemlenmemiştir ($p<0,0001$). MRSA'ya karşı ZYE yüklü niozomların MİK değeri 150 mg (229,6 µgoleuropein içermekte)/mL olarak belirlenmiştir.

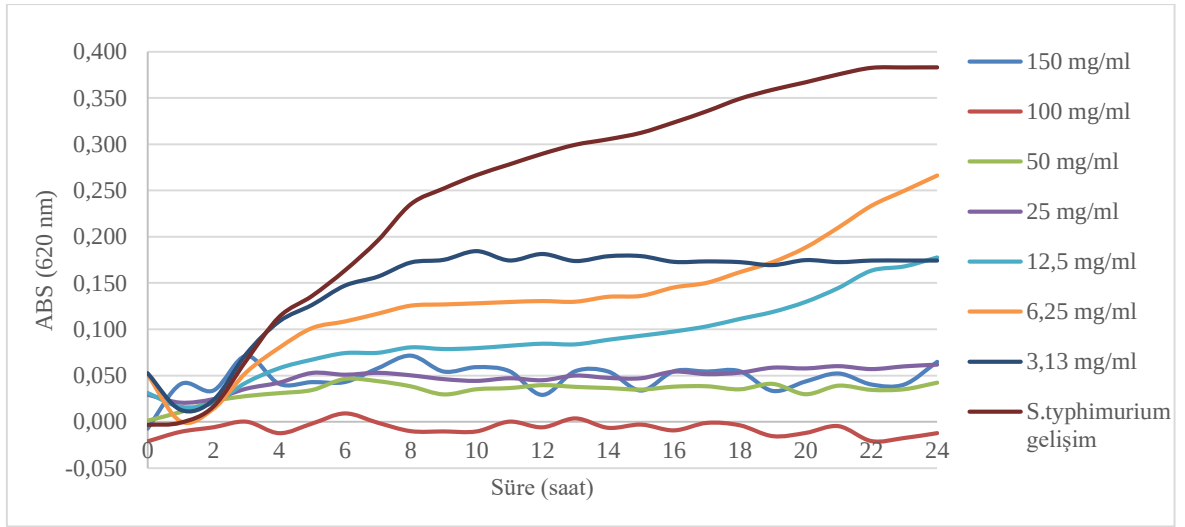
Mikrodilüsyon yöntemiyle hazırlanan grafiklerde (Şekil 4.18-4.21) boş kapsüllerin mikroorganizmaların gelişimini inhibe ettiği yorumu yapılabilmemesine rağmen toplam canlı sayımlarına göre boş kapsüller inhibitor etki göstermemektedir. Grafiklerdeki sapmalar ZYE yüklü kapsüllerin grafiklerinde olduğu gibi örneklerin süt benzeri renginden ve boş niozom örneklerinin yüksek konsantrasyonlarda hazırlanmasından kaynaklı olabilir.



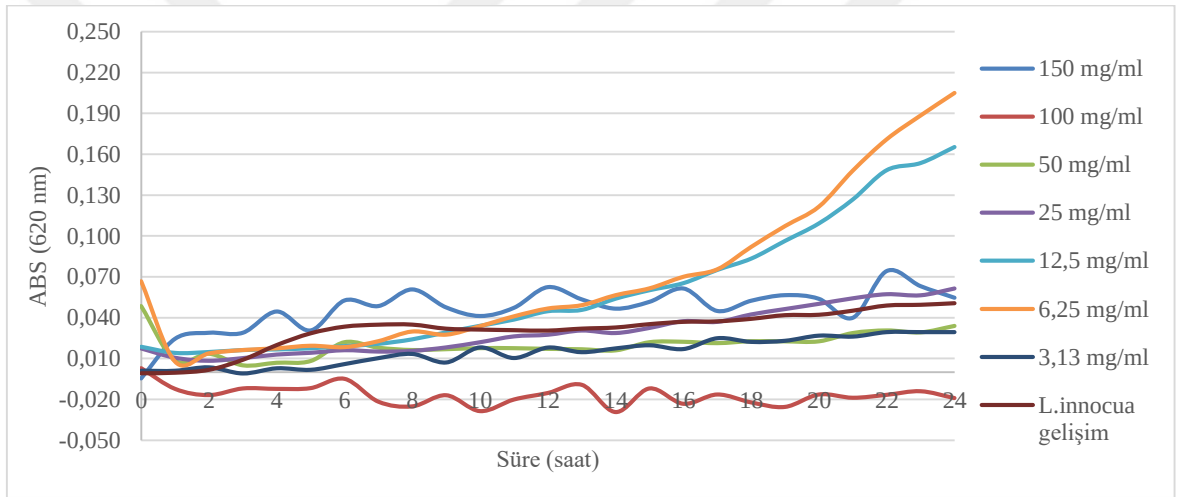
Şekil 4.18. MRSA'ya karşı boş kapsülün MİK değeri



Şekil 4.19. E.coli'ye karşı boş kapsülün MİK değeri



Şekil 4.20. *S.typhimurium*'a karşı boş kapsülün MİK değeri



Şekil 4.21. *L.innocua*'ya karşı boş kapsülün MİK değeri

ZYE yüklü niozomlarının inhibitör etkisi değerlendirildiğinde, niozomların araştırma kapsamında yer alan patojenlerden sadece MRSA üzerine antimikrobiyal etkili ajan olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonucun alınmasında, MRSA'yı diğer patojenlerden ayıran başlıca faktörün MRSA'nın ZYE'nin çok düşük konsantrasyon değerlerinde bile inhibisyonu olduğu söylenebilir. Diğer yandan, niozomal veziküllere ZYE'nin yaklaşık %40'nın yüklenebilmesi sonucu antimikrobiyal deneme amaçlı kullanılan niozomların içerdiği ZYE konsantrasyonunun da azalmış olması diğer bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna ek olarak, tek başına ZYE ektsraktı ile ZYE yüklü niozom konsantrasyonlarının MRSA üzerine etkinliği karşılaştırıldığında, miktarsal olarak yaklaşık 65 kat daha fazla ZYE yüklenmiş niozom kullanımı ile inhibisyon etkisinin sağlanabildiği görülmektedir (Çizelge 4.5). Oleuropein içeriği bakımından karşılaştırdığımızda ise,

yaklaşık 3.25 kat daha fazla oleuropein içeren niozomların, MRSA üzerine inhibisyon etkili olabildiği ortaya konmuştur. Bu nedenle, *E.coli*, *S. typhimurium* ve *L. innocua* patojenleri üzerine antimikrobiyal aktivite denemelerinde kullanılan ZYE-yüklü niozom konsantrasyonu (150 mg/mL), ZYE'nin bu patojenler üzerine etkili MİK değeri ile aynı olması sebebiyle herhangi bir etkinin gözlenmediği sonucuna varılmıştır.

Niozomal enkapsülasyon ile antimikrobiyal etkinliğin artırılması niozomlar ile mikroorganizmalar arasındaki etkileşime bağlanmıştır (Satish ve ark., 2012; Kopermsub ve ark., 2011). Bir veziküler sistem olarak niozomlar, organizmaların dış zarıyla kaynaşarak akışkanlığın artmasına neden olabilir (Satish ve ark., 2012; Huang ve ark., 2011) ve çevreye salınan ilacın geçirgenliğini artırır (Barakat ve ark., 2014). Lipozomun çift katman akışkanlığı ve füzojenik özellikleri biyolojik etkinliğini belirlemede diğer önemli faktörler gibi gözükmemektedir. Füzojenik özellikler, lipozomun bakteri dış zarıyla kaynaşmasına neden olabilir, böylece içeriğini bakteri hücrelerine iletir. Çift katmanın akışkanlığı, peptidoglikan bariyerinin lipozomlarla doğrudan temasını engelleyen gram-pozitif bakterilerde özellikle önemlidir. Belli bir akışkanlığa sahip çift katmanlı lipozomlar, dış peptidoglikan bariyeri ile etkileşime girdikten sonra içeriğini serbest bırakabilirken, katı çift katmanlı yapıya sahip lipozomlar içeriğini çok yavaş serbest bırakırlar, böylece bakteri hücrelerine karşı daha az etkili olurlar (Furneri ve ark., 2000)

Niozomun bakteri hücresinin dış mebraniyle yakından etkileşime girme yeteneğinin ardından hidrofobik veya kendiliğinden desteklenmiş metabolik yolağı aracılığıyla niozomun hücreye füzyonu ve ilacın dağıtımı ile ilişkilendirilmiştir. Niozom ile mikroorganizmaların dış zarları arasındaki füzyonlar, biyolojik membran çift katmanında düzensizlik ve akışkanlığın artmasına ve daha fazla membran geçirgenliğine neden olabilir. Veziküller, bakterilerin dış zarıyla etkileşiminin yanı sıra, ilaç konsantrasyon gradyanı yaratarak bakteri yüzeyine yakın kitlesel ilaç salınımını sağlar ve serbest ilaçtan daha hızlı penetrasyon oranını kolaylaştırır (Satish ve ark., 2012).

Lipozom için, gram-pozitif mikroorganizmalarda ilacın hücre zarı veya peptidoglikan tabakasına yakın bir şekilde serbest bırakıldığına benzer mekanizma öne sürülmüştür. Peptidoglikan tabakasının varlığı, niosomun dış hücre zarı ile olan etkileşimini sınırlandırabileceğinden, gram pozitif organizmalarda artmış aktivite için daha muhtemel bir açıklama olabilir.

İlaç nüfuzunu arttıran bir diğer faktör, porinler yoluyla taşınmayı destekleyebilen küçük boyutlu niozomal taşıyıcıların yanı sıra sulu kanallar yoluyla basit difüzyondur (Satish ve ark., 2012).

Mahajan ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada gatifloksasin ve gatifloksasin yüklü niozomun *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinliği agar difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Niozomların, sulu gatifloksasin ile eşit antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada serisin proteini yüklü niozomlar hazırlanmıştır. *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı MİK değerleri incelenmiş ve serbest ve kapsüllenmiş serisinin MİK değerlerinde anlamlı farklılık görülmemiştir (Pardakhty ve ark., 2007).

Sohrabi ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'a karşı moksifloksasin ve moksifloksasin yüklü niozomların antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir. *S. aureus* için serbest moksifloksasin ve niozomların MİK değeri 0,87 µg/mL olarak aynıdır. *P. aeruginosa* için ise serbest moksifloksasin MİK değeri 6,25 µg/mL iken niozom için MİK değeri yarıya düşerek 3,125 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Patel ve ark. (2014) tarafından propolis yüklü niozomlar hazırlanmış ve antimikrobiyal etkinlik incelenmiştir. Propolis yüklü niozom ile etanolik propolis çözeltilisinin *S. aureus*'a karşı MİK değerleri karşılaştırılmış ve sırasıyla 0,3 mg/mL ve 0,5 g/ml olarak belirlenmiştir. Vankomisin yüklü niozomların biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyen suşlara karşı antimikrobiyal etkinliği broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. MRSA için serbest vankomisinin ve vokamisin yüklü niozomun MİK değerleri sırasıyla 8 µg/mL ve 1 µg/mL'dir. MRSA'da olduğu gibi diğer mikroorganizmalara karşı serbest vankomisinin MİK değeri niozomal formundan daha yüksektir (Barakat ve ark., 2014).

Rifampisin niozomlarının antibakteriyel etkisi, akneden izole edilen *S. epidermidis* ve *S. aureus*'a karşı antibiyotik duyarlılığı ve zamana karşı hücre ölümü ile değerlendirilmiştir. Zamana karşı mikroorganizma ölümü sonuçlarına göre, bakterilerin %96'sının 4 saat içinde öldürüldüğünü ortaya konmuştur (Begum ve ark., 2015).

Gıda kaynaklı patojenlere karşı etkisi değerlendirildiğinde ZYE ve ZYE yüklü kapsüllerin antimikrobiyal ajan olarak kullanımı büyük bir potansiyele sahiptir. Elde edilen sonuçlara göre analiz edilen gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları inhibe edebileceği göstermiştir. Buna bağlı olarak bu patojenlerin oluşturduğu riskleri azaltabilmektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Enkapsülasyon sistemleri gıda nanoteknolojisinde üretim, işleme, depolama gibi birçok aşamada ürünün geliştirilmesinde yenilikçi fırsatlar sunmaktadır. Gıda endüstrisinde çevreye duyarlı, verimli ve sürdürülebilir ürünlerin üretilmesi yenilikçi yaklaşımlarla mümkündür. Enfapsülasyon teknolojisi ile gıdanın makro (görünüş, tekstür) ve mikro (biyoaktif bileşenler) özellikleri geliştirebilmekte ve yeni ürünler elde edilebilmektedir.

Antioksidan ve antimikrobiyal maddeler gibi fonksiyonel bileşikler gıda ve ilaç başta olmak üzere birçok endüstri için vazgeçilmez unsurlardır. Bu bileşenlerin çeşitli taşıma sistemlerine dâhil edilmesiyle birlikte aktif bileşene daha düşük dozajlarda kullanım kontrollü salınım ve dış etkenlere karşı koruma gibi özellikler kazandırılabilir.

Akdeniz diyetinin temel unsurlarından biri olan zeytin ve zeytin ürünleri fonksiyonel özellik gösteren fenolik bileşiklerce zenginliğiyle ön plana çıkmaktadır. Zeytin ve zeytinyağı üretiminin yan ürünlerinden biri olan zeytin yaprağı geleneksel tıbbın önemli kaynaklarından biri olduğu gibi diğer birçok özelliğiyle de dikkat çekmektedir. Doğal katkı maddelerine günden güne artan talep göz önünde bulundurulduğunda zeytin yaprağından elde edilen doğal ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden faydalanılmakta ve yeni ürün oluşturulmaktadır.

Bu tez çalışması sonucunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

Çalışmada Türkiye’den ve İtalya’dan toplanan toplamda 25 adet zeytin yaprağından hazırlanmış ZYE’nin TPC, TFC ve oleuropein içerikleri belirlenmiştir. CUPRAC ve DPPH yöntemleri kullanılarak antioksidan özellikleri de incelenmiştir.

Niozomlar Span 60 ve kolesterolün 1:1 (w/w) oranda kullanımıyla hazırlanmıştır. ZYE yüklü ve boş niozomların hazırlanması için formülasyonda toplam lipid: etken madde oranı 1:1 (w/w) olarak seçilmiştir. TPC ve oleuropein değeri en yüksek örnek olan Peranzana’dan hazırlanan ZYE niozomal enfapsülasyon için etken madde olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan ZYE yüklü ve boş niozomların morfolojik yapısının incelenmesi için ışık mikroskobu, SEM ve TEM’de görüntüleri alınmıştır. Kapsüllerin karakterizasyonu için ilk olarak enfapsülasyon verimi hesaplanmıştır. ZYE formülasyona yüklenmiş ve enfapsülasyon verimi %41,92 olarak bulunmuştur. ZYE yüklü ve boş kapsüller için zeta potansiyeli sırasıyla $-34,16 \pm 6,48$ mV ve $-70,68 \pm 4,75$, ortalama partikül boyutu ise $2,66 \pm 1,25$ μm ve $2,37 \pm 1,41$ μm olarak ölçülmüştür.

E.coli, *S. typhimurium*, *L. innocua* ve MRSA için ZYE, ZYE yüklü ve boş niozomların MIK değerinin belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. ZYE'nin MIK değeri *E.coli*, *S. typhimurium*, *L. innocua* için 150 mg/mL, MRSA için ise 2,34 mg/mL olarak bulunmuştur. Toplam canlı sayımıyla mikrodilüsyon yöntemi sonuçları kıyaslanarak ZYE'nin inhibitör etkisi doğrulanmıştır.

ZYE yüklü niozomlar için hazırlanan maksimum konsantrasyon olan 150 mg/mL *E.coli*, *S. typhimurium*, *L. innocua* için yeterli inhibitör etki göstermemiştir. MRSA için ise ZYE yüklü niozomların MIK değeri 150 mg/mL olarak belirlenmiştir. Toplam canlı sayımıyla mikrodilüsyon yöntemi sonuçları kıyaslanarak ZYE yüklü niozomların inhibitör etkisi doğrulanmıştır.

Boş kapsüllerin antimikrobiyal aktivite göstermediği inkübe edilecek numunelerden 0. ve 18. saatte alınan örneklerdeki toplam canlı sayımları karşılaştırılarak gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında;

Bitki ekstraktlarının niozomal enkapsülasyonu yenilikçi bir yaklaşım sergilemektedir. Bununla birlikte farklı bitki ekstraktlarının ve daha yüksek antimikrobiyal etki gösteren maddelerin kullanımı, daha yüksek enkapsülasyon verimlerine ulaşılması ve işlem parametrelerinin iyileştirilmesi bitki ekstraktı yüklenmiş niozomların biyoyararlanımı ve antimikrobiyal etkinliğini arttıracakı düşünülmektedir.

Hazırlanan ZYE ve niozomların stabilite çalışmalarının yapılması, hücre kültürleri üzerine toksisite vd. etkilerinin incelenmesi ve model gıda sistemlerinde denemelerin yapılması daha ileri derecede bilgi verecektir.

KAYNAKLAR

- Abaza B.L., Youssef N.B., Manai H., Haddada F.M., 2011. Chétoui Olive Leaf Extracts: Influence of The Solvent Type on Phenolics and Antioxidant Activities. *Test*, 62 (1), 96–104.
- Abdelaziz A.A., Elbanna T.E., Sonbol F.I., Gamaleldin N.M., Maghraby G.M.E., 2014. Optimization of Niosomes for Enhanced Antibacterial Activity and Reduced Bacterial Resistance: in vitro and in vivo Evaluation. *Expert Opin Drug Deliv.*, 12 (2): 163–180.
- Abdelkader H., Alani A.W.G., Alany R.G., 2013. Recent Advances in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Self-Assembly, Fabrication, Characterization, Drug Delivery Applications and Limitations. *Drug Delivery*, 21 (2): 87-100.
- Abdelkader H., Ismail S., Kamal A., Alany R.G., 2011. Design and Evaluation of Controlled-Release Niosomes and Discomes for Naltrexone Hydrochloride Ocular Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (5): 1833–1846.
- Abdelkader H., Kamal A., Alany, R.G., 2010. Preparation of Niosomes as an Ocular Delivery System for Naltrexone Hydrochloride: Physicochemical Characterization. *Pharmazie*, 65 (11): 811–817.
- Agarwal S., Bakshi V., Vitta P., Raghuram A.P., Pandey S., Udupa, N., 2004. Effect of Cholesterol Content and Surfactant HLB on Vesicle Properties of Niosomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61 (1): 121–3.
- Aggarwal D., Garg A., Kaur I.P., 2004. Development of a Topical Niosomal Preparation of Acetazolamide: Preparation and Evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56 (12): 1509–1517.
- Ahmed A.M., Rabii N.S., Garbaj A.M., Abolghait S.K., 2014. Antibacterial Effect of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves Extract in Raw Peeled Undeveined Shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2 (1): 53–56.
- Akarca G., Gök V., Tomar O., 2014. Some National Antimicrobials Used in Food Preservation. *Kocatepe Veterinary Journal*, 7: 59–68.

- Alam M., Dwivedi V., Khan A.A., Mohammad O., 2009. Efficacy of Niosomal Formulation Of Diallyl Sulfide Against Experimental Candidiasis in Swiss Albino Mice. *Nanomedicine*, 4 (7): 713–724.
- Alam M., Zubair S., Farazuddin M., Malik A., Mohammad O., 2013. Development, Characterization and Efficacy of Niosomal Diallyl disulfide in Treatment of Disseminated Murine Candidiasis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9 (2): 247–256.
- Alexander K.A., Warnick L.D., 2009. Antimicrobial Resistant Salmonella in Dairy Cattle in the United States, 33 (3): 191–209.
- Al-Rimawi F., 2014. Development and Validation of a Simple Reversed-Phase HPLC-UV Method for Determination of Oleuropein in Olive Leaves. *J. Food Drug Anal.*, 22: 285–289.
- Al-Rimawi F., Abu-Lafi S., Abbadi J., Alamarneh A.A.A., Sawahreh R.A., Ohed I., 2017. Analysis of Phenolic and Flavonoids of Wild Ephedra Alata Plant Extracts By LC/PDA and LC/MS and Their Antioxidant Activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 14 (2): 130–141.
- Altıok E., Bayçın D., Bayraktar O. Ülkü S. 2008. Isolation of Polyphenols From The Extracts Of Olive Leaves (*Olea europaea* L.) by Adsorption On Silk Fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62 (2): 342–348.
- Anandharamakrishnan C., 2014. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients. (R. W. Hartel, Ed.). Springer. 89.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D., 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12 (7): 1496-1547.
- Apak R., Güçlü K., Ozyürek M., Karademir S.E., 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric İon Reducing Capability in The Presence of Neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26): 7970–7981.

- Arshady R., 1993. Microcapsules for Food. *Journal of Microencapsulation* 10 (4): 413–435.
- Arunothayanun P., Bernard M.S., Craig D.Q.M., Uchegbu I.F., Florence A.T., 2000. The Effect of Processing Variables on the Physical Characteristics of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) Formed From a Hexadecyl Diglycerol Ether. *International Journal of Pharmaceutics*, 201 (1): 7–14
- Aswathy K.S., John R.mol K., 2014. Design, Characterization and Evaluation of Latanoprost Niosomes for Glaucoma Treatment. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3 (6): 558–562.
- Attia I.A., El-Gizawy S.A., Fouda M.A., Donia A.M. 2007. Influence of a Niosomal Formulation on the Oral Bioavailability of Acyclovir in Rabbits. *AAPS PharmSciTech*, 8 (4): 206–212.
- Azmin M.N., Florence A.T., Handjani-Vila R., Stuart J.F.B., Vanlerberghe G., Whittaker J.S., 1985. The Effect of Non-Ionic Surfactant Vesicle (Niosome) Entrapment on The Absorption and Distribution of Methotrexate in Mice. *J. Pharm. Pharmacol*, 37 (4): 237–242.
- Azmin M.N., Florence A.T., Handjani-Vila R., Stuart J.F.B., Vanlerberghe G., Whittaker J.S., 1986. The Effect of Niosomes and Polysorbate 80 on The Metabolism and Excretion of Methotrexate in The Mouse. *J. Microencapsulation*, 3 (2): 95–100.
- Baillie A.J., Coombs G.H., Dolan T.F., Laurie J., 1986. Non-ionic Surfactant Vesicles , Niosomes , as a Delivery System for the Anti-leishmania¹ Drug , Sodium stibogluconate. *J. Pharm. Pharmacol*, 38 (7): 502–505.
- Baillie A.J., Florence A.T., Hume L.R., Muirhead G.T., Rogerson A., 1985. The Preparation and Properties of Niosomes-Non-ionic Surfactant Vesicles. *J. Pharm. Pharmacol*, 37 (12): 863–868.
- Balakrishnan P., Shanmugam S., Lee W.S., Lee W.M., Kim J.O., Oh D.H., im J.S., Yoo B.K., Choi H.G., Woo J.S., Yong C.S., 2009. Formulation and in vitro Assessment of Minoxidil Niosomes for Enhanced Skin Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 377 (1–2): 1–8.

- Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6 (2): 71–79.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., 1965. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13 (1): 238–252.
- Bansode S.S., Banarjee S.K., Gaikwad D.D., Jadhav S.L., Thorat R.M., 2010. Microencapsulation: a Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1 (2): 38–43.
- Barakat H.S., Kassem M.A., El-Khordagui L.K., Khalafallah N.M., 2014. Vancomycin-Eluting Niosomes: A New Approach to the Inhibition of Staphylococcal Biofilm on Abiotic Surfaces. *AAPS PharmSciTech*, 15 (5): 1263-1274.
- Basiri L., Rajabzadeh G., Bostan A., 2017. α -Tocopherol-Loaded Niosome Prepared by Heating Method and Its Release Behavior. *Food Chemistry*, 221: 620–628
- Begum K., Khan A.F., Hana H.K., Sheak J., Jalil R., 2015. Rifampicin Niosome : Preparations, Characterizations and Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Acne. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, 14 (1): 117–123.
- Ben Salah M., Abdelmelek H., 2012. Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal Chemistry*, 2 (5): 107–111.
- Benavente-García O., Castillo J., Lorente J., Ortuño A., Del Rio J.A., 2000. Antioxidant Activity of Phenolics Extracted From *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry*, 68 (4): 457–462.
- Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Bertelli D., 2004. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes and Aronia. *J Food Sci* 69: 164–169.
- Bhatia S., 2016. Nanoparticles Types , Classification , Characterization , Fabrication Methods. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems Nanoparticles, Plants and Algae*. Springer. 33–93.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A., 1999. On the in-

- vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51 (8): 971–974.
- Blazek-Welsh A., Rhodes D.G., 2001. Maltodextrin-Based Proniosomes. *AAPS PharmSci*, 3 (1): 1–8.
- Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi, S., 2008. Effect of Storage on Refined and Husk Olive Oils Composition: Stabilization by Addition of Natural Antioxidants from Chemlali Olive Leaves. *Food Chemistry*, 108 (1): 253–262.
- Bravo L., 2009. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11): 317–333.
- Bubonja-Sonje M., Giacometti J., Abram, M., 2011. Antioxidant and Antilisterial Activity of Olive Oil, Cocoa And Rosemary Extract Polyphenols. *Food Chemistry*, 127 (4): 1821–1827.
- Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C., 2015. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems - A Review. *Food Control*, 54: 111–119.
- Carter K.C., Baillie A.J., Alexander J., Dolan T.F., 1988. The Therapeutic Effect Of Sodium stibogluconate in BALB/c Mice Infected with *Leishmania donovani* is Organ-dependent. *J. Pharm. Pharmacol*, 40 (5): 370–373.
- Casas-Sanchez J., Alsina A.M., Herrlein M.K., Mestres C., 2007. Interaction between the Antibacterial Compound, Oleuropein, and Model Membranes. *Colloid and Polymer Science*, 285 (12): 1351–1360.
- Caturla N., Perez-Fons L., Estepa A., Micol V., 2005. Differential Effects of Oleuropein, a Biophenol from *Olea europaea*, on Anionic and Zwitterionic Phospholipid Model Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 137 (1-2): 2–17.
- Chandraprakash K.S., Udupa N., Umadevi P., Pillai G.K., 1990. Pharmacokinetic Evaluation of Surfactant Vesicle Entrapped Methotrexate in Tumor Bearing Mice. *Int. J. Pharm*, 61: 1-4.
- Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3): 178-182.

- Chen L., Remondetto E., Subirade M., 2006. Food Protein-Based Materials as Nutraceutical Delivery Systems, 17: 272–283.
- Cicerale S., Lucas L., Keast R., 2010. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2): 458–479.
- Ciriminna R., Meneguzzo F., Fidalgo A., Ilharco L.M., Pagliaro M., 2016. Extraction, Benefits and Valorization Of Olive Polyphenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118 (4): 503–511.
- Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564–82.
- Dada E.O., 2013. Antibacterial Activities of *Olea europaea* Leaf Extract on Some Bacteria Isolated from a Refused Dump Site in Akure , Nigeria. *Journal of Biology*, 1 (6): 118–124.
- Dai J., Mumper R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15 (10): 7313–7352.
- de Bock M., Thorstensen E.B., Derraik J.G.B., Henderson H.V., Hofman P.L., Cutfield W. S. (2013). Human Absorption and Metabolism of Oleuropein and Hydroxytyrosol Ingested as Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57 (11): 2079–2085.
- Debib A., Boukhatem M.N., 2017. Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of “Chemlali” Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Extracts. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 6: 38–46
- Denis P., 2006. Microencapsulation: Fundamentals, Methods and Applications. *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*, 23–34.
- Desai K.G.H., Park H.J., 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 23 (7): 1361-1394.
- Desai S., Doke A., Disouza J., Athawale R., 2011. Development and Evaluation of Antifungal Topical Niosomal Gel Formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (5): 224–231.

- Devaraj G.N., Parakh S.R., Devraj R., Apte S.S., Rao B.R., Rambhau D., 2002. Release Studies on Niosomes Containing Fatty Alcohols as Bilayer Stabilizers Instead of Cholesterol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 251 (2): 360–365.
- Diljyot K., 2012. Niosomes : A New Approach to Targeted Drug Delivery. *Int.J.Pharm.Phytopharmacol.Res.*, 2 (1): 53–59.
- El Maghraby G.M., Williams A.C., 2009. Vesicular Systems for Delivering Conventional Small Organic Molecules and Larger Macromolecules to and Through Human Skin. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 6 (2): 149–163.
- El-Ridy M.S., Badawi A.A., Safar M.M., Mohsen A.M., 2012. Niosomes As a Novel Pharmaceutical Formulation Encapsulating the Hepatoprotective Drug Silymarin. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (1): 549–559.
- Erdohan Z.Ö., Turhan K.N., 2011. Olive Leaf Extract And Usage For Development Of Antimicrobial Food Packaging. In *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research And Technological Advances*. 1094–1101.
- Esti M., Cinquanta L., La Notte E., 1998. Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1): 32–35.
- Ezhilarasi P.N., Karthik P., Chhanwal N., Anandharamakrishnan C., 2013. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components : A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (3): 628–647.
- Fang C., Shi B., Pei Y.Y., Hong M.H., Wu J., Chen H.Z., 2006. In vivo Tumor Targeting of Tumor Necrosis Factor- α -loaded Stealth Nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1): 27–36.
- Fang Z., Bhandari B., 2010. Encapsulation of Polyphenols - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21 (10): 510–523.
- Friedman M., 2007. Overview of Antibacterial, Antitoxin, Antiviral, And Antifungal Activities of Tea Flavonoids And Teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (1): 116–134.

- Furneri P.M., Fresta M., Puglisi G., Tempera G., 2000. Ofloxacin-Loaded Liposomes: in vitro Activity and Drug Accumulation in Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (9): 2458-2464.
- Ghosh, S. K. (2006). Functional coatings and microencapsulation: a general perspective, in: S.K. Ghosh (Ed.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 26.
- Girigoswami A., Das S., De S., 2006. and Dynamic Light Scattering Studies of Niosomes-Membrane Mimetic Systems. *Spectrochimica Acta Part A*, 64 (4): 859–866.
- Goldsmith C., Vuong Q., Sadeqzadeh E., Stathopoulos C., Roach P., Scarlett C., 2015. Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells. *Molecules*, 20 (7): 12992–13004.
- Goldsmith C., Vuong Q., Stathopoulos C., Roach P., Scarlett C., 2014. Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Antioxidants*, 3 (4): 700–712.
- Gopinath D., Ravi D., Rao B.R., Apte S.S., Renuka D., Rambhau D., 2004. Ascorbyl Palmitate Vesicles (Aspasomes): Formation, Characterization and Applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 271 (1–2): 95–113.
- Gouin S., 2004. Micro-Encapsulation : Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (7-8): 330–347.
- Handjani-Vila R., Ribier A., Rondot B., Vanlerberghie G., 1979. Dispersions of Lamellar Phases of Non-Ionic Lipids in Cosmetic Products. *International Journal of Cosmeric Science*, 1: 303–314.
- Hao Y., Zhao F., Li N., Yang Y., Li K., 2002. Studies on a High Encapsulation of Colchicine by a Niosome System. *International Journal of Pharmaceutics*, 244 (1–2): 73–80.
- Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O’Grady M.N., Kerry J.P., 2011. Phenolic Composition and in vitro Antioxidant Capacity of Four Commercial Phytochemical Products: Olive Leaf Extract (*Olea europaea* L.), Lutein, Sesamol and Ellagic acid. *Food Chemistry*, 126 (3): 948–955.

- Hope M.J., Bally M.B., Mayer L.D., Janoff A.S., Cullis P.R., 1986. Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid Vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40: 89–107.
- Hu C., Rhodes D.G., 1999. Proniosomes : A Novel Drug Carrier Preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, 185 (1): 23–35.
- Huang C.M., Chen C.H., Pornpattananangkul D., Zhang L., Chan M., Hsieh M.F., Zhang L., 2011. Eradication of Drug Resistant *Staphylococcus aureus* by Liposomaloleic Acids. *Biomaterials*, 32 (1): 214–21.
- Hunter C.A., Dolan T.F., Coombs G.H., Baillie A.J., 1988. Vesicular Systems (Niosomes and Liposomes) for Delivery of Sodium Stibogluconate in Experimental Murine Visceral Leishmaniasis. *J. Pharm. Pharmacol*, 40 (3): 161–165.
- Hussain A., Qarshi I.A., Liaqat R., Akhtar S., Aziz I., Ullah I., Shinwari K.Z., 2014. Antimicrobial Potential of Leaf and Fruit Extracts and Oils of Wild and Cultivated Edible Olive. *Pak. J. Bot*, 46 (4): 1463–1468.
- Israelachvili J.N., 2011. *Intermolecular and Surface Forces (Third)*. Elsevier Inc. 535-617.
- Israelachvili J.N., Marcelja S., Horn R.G., 1980. Physical Principles of Membrane Organization. *Quarterly Reviews of Biophysic*, 13 (2): 121–200.
- Jacobs C., Kayser O., Müller R.H., 2000. Nanosuspensions as a New Approach for the Formulation for the Poorly Soluble Drug Tarazepide. *International Journal of Pharmaceutics*, 196 (2): 161–164.
- Janakat S., Al-Nabulsi A.A.R., Allehdan S., Olaimat A.N., Holley R.A., 2015. Antimicrobial Activity of Amurca (olive oil lees) Extract Against Selected Foodborne Pathogens. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35 (2): 259–265.
- Jatav V.S., Singh S.K., Khatri Pa., Sharma A.K., Singh R., 2011. Formulation and in-vitro Evaluation of Rifampicin-Loaded Niosomes. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3 (2): 199–203.
- Jemai H., Feki A.E.L., Sayadi S., 2009. Antidiabetic and Antioxidant Effects Of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (19): 8798–8804.

- Jorgensen J.H., Ferraro M.J., 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing : A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin Infect Dis., 49 (11): 1749–1755.
- Junyaprasert V.B., Teeranachaideekul V., Supaperm T., 2008. Effect of Charged and Non-ionic Membrane Additives on Physicochemical Properties and Stability of Niosomes. AAPS PharmSciTech, 9 (3): 851–859.
- Jyothi N.V.N., Prasanna P.M., Sakarkar S.N., Prabha K.S., Ramaiah P.S., Srawan G.Y., 2010. Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency. Journal of Microencapsulation, 27 (3): 187–197.
- Karewicz A., Bielska D., Gzyl-Malcher B., Kepczynski M., Lach R., Nowakowska M., 2011. Interaction of Curcumin with Lipid Monolayers and Liposomal Bilayers. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 88 (1): 231–239.
- Karki R., Mamatha G.C., Subramanya G., Udupa N., 2008. Preparation, Characterization and Tissue Disposition of Niosomes Containing Isoniazid. Rasayan Journal of Chemistry, 1 (2): 224–227.
- Kaur H., Dhiman S., Arora S., 2012. Niosomes : A Novel Drug Delivery System. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 15 (1): 113–120.
- Kaur I.P., Garg A., Singla A.K., Aggarwal D., 2004. Vesicular Systems in Ocular Drug Delivery : An Overview. International Journal of Pharmaceutics, 269 (1): 1–14.
- Kerr D.J., Rogerson A., Morrison G.J., Florence A.T., Kaye S.B., 1988. Antitumour Activity and Pharmacokinetics of Niosome Encapsulated Adriamycin in Monolayer, Spheroid and Xenograft. British Journal of Cancer, 58 (4): 432–436.
- Khaliq A., Sabir S.M., Ahmad S.D., Boligon A.A., Athayde M.L., Jabbar A., Qamar I., Khsan A., 2015. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Olive (*Olea europaea*) Leaves. Applied Botany and Food Quality, 88 (1): 16–21.
- Khindri S., Aggarwal G., Kumar H.S., 2015. Role of Niosomes and Proniosomes for Enhancing Bioavailability of Drugs. Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 5 (1): 28–33.

- Kiwada H., Niimura H., Kato Y., 1985. Tissue Distribution and Pharmacokinetic Evaluation of the Targeting Efficiency of Synthetic Alkyl Glycoside Vesicles. *Chem. Pharm. Bull*, 33 (6): 2475–2482.
- Kopermsub P., Mayen V., Warin C., 2011. Potential Use of Niosomes for Encapsulation of Nisin and EDTA and Their Antibacterial Activity Enhancement. *Food Res Int*, 44 (2): 605-12.
- Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A., Ozer E.T., Gucer S., 2010. Antibacterial Activity and Chemical Constitutions of *Olea europaea* L. Leaf Extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34 (3): 383–396.
- Kuete V., Metunob R., Ngamenib B., Tsafack A.M., Ngandeuc F., Fo G.W., Bezabih M., Etoa F-X., Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Benga V.P., 2007. Antimicrobial Activity of the Methanolic Extracts and Compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). *J. Ethno-phar.*, 112 (3): 531–536.
- Kumar G.P., Rajeshwarrao P., 2011. Nonionic Surfactant Vesicular Systems for Effective Drug Delivery-An Overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1 (4): 208–219.
- Kumari A., Singla R., Guliani A., Yadav S.K., 2014. Nanoencapsulation for Drug Delivery. *EXCLI Journal*, 2014 (13): 265-286.
- Lee O.H., Lee B.Y., 2010. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Individual and Combined Phenolics in *Olea Europaea* Leaf Extract. *Bioresource Technology*, 101 (10): 3751–3754.
- Lee-Huang S., Zhang L., Huang P.L., Chang Y.T., Huang P.L., 2003. Anti-HIV Activity of Olive Leaf Extract (OLE) and Modulation of Host Cell Gene Expression by HIV-1 Infection and OLE Treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307 (4): 1029–1037.
- Liang R., Chen L., Yokoyama W., Williams P.A., Zhong F., 2016. Niosomes Consisting of Tween-60 and Cholesterol Improve the Chemical Stability and Antioxidant Activity of (-)-Epigallocatechin Gallate under Intestinal Tract Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (48): 9180–9188.

- Lo C.T., Jahn A., Locascio L.E., Vreeland W.N., 2010. Controlled Self-Assembly of Monodisperse Niosomes by Microfluidic Hydrodynamic Focusing. *Langmuir*, 26 (11): 8559–8566.
- Lopez-rubio A., Lagaron J.M., 2006. Bioactive Packaging : Turning Foods Into Healthier Foods Through Biomaterials. *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006): 567-575.
- Loumou A., Giourga C., 2003. Olive Groves: “The Life and Identity of The Mediterranean.” *Agriculture and Human Values*, 20 (1): 87–95.
- Luo H., 2011. Extraction of Antioxidant Compounds from Olive (*Olea europaea*) Leaf. (Yüksek Lisans Tezi) Massey University, Yeni Zellanda.
- Mahajan H.S., Shah N.N., Nerkar P.P., Kulkarni A., Patel R.C., 2012. Niosomes Encapsulated with Gatifloxacin for Ocular Drug Delivery. *Recent Advances in Pharmaceutical Science Research* 1 (1): 28–39.
- Mahmoudi S., Khali M., Benkhaled A., Benamirouche K., Baiti I., 2016. Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaf Extracts From Ten Algerian *Ficus carica* L. Varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (3): 239–245.
- Malik N.S.A., Bradford J.M., 2008. Recovery and Stability of Oleuropein and Other Phenolic Compounds During Extraction and Processing of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 6 (2): 8–13.
- Manosroi A., Chutoprapat R., Abe M., Manosroi J., 2008. Characteristics of Niosomes Prepared by Supercritical Carbon Dioxide (scCO₂) Fluid. *International Journal of Pharmaceutics*, 352 (1-2): 248–255.
- Manosroi A., Wongtrakul P., Manosroi J., Sakai H., Sugawara F., Yuasa M., Abe M., 2003. Characterization of Vesicles Prepared With Various Non-Ionic Surfactants Mixed with Cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30: 129–138.
- Marianecchi C., Di Marzio L., Rinaldi F., Celia C., Paolino D., Alhaique F., Esposito S., Carafa M., 2014. Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205: 187–206.

- Marva A., Sammour O., El-Ghamry H., Abu-Selem M., 2013. Preparation and in-Vitro Evaluation of Diclofenac Sodium Niosomal Formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4 (5): 1757–65.
- Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R., Janoff A.S., 1985. Solute Distributions and Trapping Efficiencies Observed in Freeze-Thawed Multilamellar Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 817 (1): 193-196.
- McMullen T.P.W., McElhaney R.N., 1996. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1: 83–90.
- Mills I., Cvitas T., Homann K., Kallay N., Kuchitsu K., 1993. *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry (Second)*. Blackwell Science. 139.
- Moazeni E., Gilani K., Sotoudegan F., Pardakhty A., Najafabadi A.R., Ghalandari R., Jamalifar H., 2010. Formulation and in vitro Evaluation of Ciprofloxacin Containing Niosomes for Pulmonary Delivery. *Journal of Microencapsulation*, 27 (7): 618–627.
- Moghassemi S., Hadjizadeh A., 2014. Nano-niosomes as Nanoscale Drug Delivery Systems : An Illustrated Review . *Journal of Controlled Release*, 185: 22–36.
- Mokhtar M., Sammour O.A., Hammad M.A., Megrab N.A., 2008. Effect of Some Formulation Parameters on Flurbiprofen Encapsulation and Release Rates of Niosomes Prepared from Proniosomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 361 (1-2): 104–111.
- Morsy N.F.S., Abdel-Aziz E.M., 2014. Efficiency of Olive (*Olea europaea* L .) Leaf Extract as Antioxidant and Anticancer Agents. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20 (1): 46-53.
- Mozafari M.R., Flanagan J., Matia-Merino L., Awati A., Omri A., Suntres Z.E., Singh H., 2006. Recent Trends In The Lipid - Based Nanoencapsulation of Antioxidants and Their Role in Foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (13): 2038-2045.
- Mukherjee B., Patra B., Layek B., Mukherjee A., 2007. Sustained Release of Acyclovir from Nano- liposomes and Nano-niosomes : An in vitro Study. *International Journal of Nanomedicine*, 2 (2): 213–225.

- Niozomun Şematik Gösterimi. Online. 20 Haziran 2017, (Anonim, 2016)
<https://www.procarehealth.fr/composition>
- Nasir A., SL H., Amanpreet K., 2012. Niosomes : An Excellent Tool For Drug Delivery, 2 (2): 479–487.
- Nasr M., Mansour S., Mortada N.D., Elshamy A.A., 2008. Vesicular Aceclofenac Systems : A comparative Study Between Liposomes and Niosomes. Journal of Microencapsulation, 25 (7): 499–512.
- Ning M., Guo Y., Pan H., Zong S., Gu Z., 2006. Preparation and Characterization of EP-liposomes and Span 40-niosomes. Pharmezie, 61: 208–212.
- Öztürk M., Aydoğmuş Öztürk F., Duru M.E., Topçu, G., 2007. Antioxidant Activity Of Stem And Root Extracts Of Rhubarb (*Rheum ribes*): An Edible Medicinal Plant. Food Chemistry, 103 (2): 623–630.
- Pardakhty A., Moazeni E., Varshosaz J., Hajhashemi V., Rouholamini Najafabadi A., 2011. Pharmacokinetic Study of Niosome-loaded Insulin in Diabetic Rats. Daru : Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, 19 (6): 404–11.
- Pardakhty A., Varshosaz J., Rouholamini A., 2007. In vitro Study of Polyoxyethylene Alkyl Ether Niosomes for Delivery of Insulin. International Journal of Pharmaceutics, 328 (2): 130–141.
- Patel J., Ketkar S., Patil S., Fearnley J., Mahadik K., Paradkar A., 2014. Potentiating Antimicrobial Efficacy of Propolis Through Niosomal-Based System For Administration. Integrative Medicine Research, 4 (2): 1–8.
- Pawar H.A., Attarde V.B., Parag Subhash G., 2016. Optimization of Bifonazole-Loaded Nisomal Formulation Using Plackett-Burman Design and 23 Factorial Design. Open Pharmaceutical Sciences Journal, 3 (1): 31–48.
- Pereira A.P., Ferreira I.C., Marcelino F., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A., 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. Molecules, 12 (5): 1153–1162.

- Petridis A., Therios I., Samouris G., 2012. Genotypic Variation of Total Phenol and Oleuropein Concentration and Antioxidant Activity of 11 Greek Olive Cultivars (*Olea europaea* L.). *HortScience*, 47 (3): 339–342.
- Pirvu C.D., Hlevca C., Ortan A., Prisada R., 2010. Elastic Vesicles As Drugs Carriers Through The Skin. *Farmacia*, 58 (2): 128–135.
- Preetz C., Hauser A., Hause G., Kramer A., Mäder K., 2010. Application of Atomic Force Microscopy and Ultrasonic Resonator Technology on Nanoscale : Distinction of Nanoemulsions from Nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31;39 (1-3): 141–151.
- Rajera R., Nagpal K., Singh S.K., Mishra D.N., 2011. Niosomes : A Controlled and Novel Drug Delivery System. *Biol. Pharm. Bull.*, 34 (7): 945–953.
- Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D., Di Fonzo V., 2006. Factors Affecting The Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2): 434–440.
- Rangasamy M., Ayyasamy B., Raju S., Gummadevelly S., Shaik S., 2008. Formulation and in Vitro Evaluation of Niosome Encapsulated Acyclovir. *Journal of Pharmacy Research*, 1 (2): 163–166.
- Rijo P., Matias D., Fernandes A.S., Simões M.F., Nicolai M., Reis C.P., 2014. Antimicrobial Plant Extracts Encapsulated into Polymeric Beads for Potential Application on The Skin. *Polymers*, 6 (2): 479–490.
- Risch S., 1995. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients ACS Symposium Series*; American Chemical Society: Washington, DC. 2-7.
- Rogerson A., Cummings J., Willmott N., Florence A.T., 1988. The Distribution Of Doxorubicin In Mice Following Administration in Niosomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40 (5), 337–342.
- Ruckmani K., Sankar V., 2010. Formulation and Optimization of Zidovudine Niosomes. *AAPS PharmSciTech*, 11 (3): 1119–1127.

- Ruksiriwanich W., Sringarm K., Jantrawut P., 2014. Stability Enhancement of *Celastrus Paniculatus* Seed Oil by Loading in Niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7 (2): 186–191.
- Sajal J.K., Uday S.R., Surendra V., 2015. Taste Masking in Pharmaceuticals : An update. *Journal of Pharmacy Research*, 1: 126–130.
- Sankaram M.B., Thompson T.E., 1990. Modulation of Phospholipid Acyl Chain Order by Cholesterol . A Solid-State ²H Nuclear Magnetic Resonance Study. *Biochemistry*, 29 (47): 10676–10684.
- Satish J., Amusa A.S., Gopalakrishna P., 2012. In vitro Activities of Fluoroquinolones Entrapped in Non-ionic Surfactant Vesicles against Ciprofloxacin-Resistant Bacteria Strains. *J Pharm Technol DrugRes*, 1 (1): 1-11.
- Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K., Balansard G., 2001. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2): 618–621.
- Sezgin Bayındır Z., Yüksel N., 2010. Characterization of Niosomes Prepared With Various Nonionic Surfactants for Paclitaxel Oral Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99 (4): 2049–2060.
- Shakya V., Bansal B.K., 2014. Niosomes : A Novel Trend in Drug Delivery. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 3 (4): 1036–1041.
- Shekhar K., Madhu M.N., Pradeep B., Banji D., 2010. A Review on Microencapsulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5 (2): 58–62.
- Silva H.D., Cerqueira M.Â., Vicente A.A., 2012. Nanoemulsions for Food Applications : Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (3): 854–867.
- Silva S., Gomes L., Leitao F., Coelho V., Boas L.V., 2006. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*, 12 (5): 385–395.

- Simunkova H., Pessenda-Garcia P., Wosik J., Angerer P., Kronberger H., Nauer G.E., 2009. The Fundamentals of Nano- and Submicro-Scaled Ceramic Particles Incorporation into Electrodeposited Nickel Layers : Zeta potential measurements. *Surface & Coatings Technology*, 203 (13): 1806–1814.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journ. of Enology and Vitic.*, 16: 144–158.
- Sohrabi S., Haeri A., Mahboubi A., Mortazavi A., Dadashzadeh S., 2016. Chitosan Gel-Embedded Moxifloxacin Niosomes: An Efficient Antimicrobial Hybrid System for Burn Infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 625–633.
- Solanki A., Parikh J., Parikh R., 2008. Preparation , Characterization , Optimization and Stability Studies of Aceclofenac Proniosomes. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (4): 237–246.
- Soni M.G., Burdock G.A., Christian M.S., Bitler C.M., Crea R., 2006. Safety Assessment of Aqueous Olive Pulp Extract as an Antioxidant or Antimicrobial Agent in Foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (7): 903–915.
- Sonia A., Bharat P., Hitesh D., Abhishek C., Varun T., 2012. Niosomes: The Unique Vesicular Drug Carriers. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2 (1): 96–101.
- Sorgi F.L., Huang L., 1996. Large Scale Production of DC-Chol Cationic Liposomes by Microfluidization. *International Journal of Pharmaceutics*, 144 (2): 131–139.
- Spencer J.P., 2008. Flavonoids: modulators of brain function? *The British Journal of Nutrition*, 99 E Suppl, 1: ES60-77.
- Stan C.D., Tătăringă G., Gafițanu C., Drăgan M., Braha S., Popescu M.C., Lîsă G., Ștefanache A., 2013. Preparation and Characterization of Niosomes Containing Metronidazole. *Farmacia*, 61 (6): 1178–1185.
- Steed J., Turner D., Wallace K., 2008. Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry. John Wiley & Sons., USA. 266-272.

- Sudjana A.N., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T.V., Hammer, K.A., 2009. Antimicrobial Activity of Commercial *Olea europaea* (Olive) Leaf Extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33 (5): 461–463.
- Szoka F.J., Papahadjopoulos D., 1978. Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 (9): 4194–4198.
- Şahin N.Ö., 2007. Niosomes as Nanocarrier Systems. In M. R. Mozafari (Ed.), *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. Springer. 67–81.
- Şimşek T., Altınışik U., Erşan İ., Şahin H., Altınışik B., Erbaş M., Pala Ç., 2016. Prevention of Intraocular Pressure Elevation with Oleuropein Rich Diet in Rabbits, During the General Anaesthesia. *SpringerPlus* 5 (1): 952.
- Taamalli A., Arráez-Román D., Zarrouk M., Valverde J., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., 2012. The Occurrence and Bioactivity of Polyphenols in Tunisian Olive Products and by-Products: A Review. *Journal of Food Science*, 77 (4): R83–R92.
- Tabera J., Guinda Á., Ruiz-Rodríguez A., Señoráns F.J., Ibáñez E., Albi T., Reglero G., 2004. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15): 4774–4779.
- Talsma H., Van Steenberg M.J., Borchert J.C.H., Crommelin D.J.A., 1994. Novel Technique for the One-Step Preparation of Liposomes and Nonionic Surfactant Vesicles without the Use of Organic Solvents. Liposome Formation in a Continuous Gas Stream: The “Bubble” Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83 (3): 276–280.
- Thies, C., 2005. Microencapsulation 1. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* John Wiley & Sons. 438–463.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O’Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J., 2009. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (14): 5987–6000.

- Tu Y.S., Sun D.M., Zhang J.J., Jiang Z.Q., Chen Y.X., Zeng X.H., Huan D.E., Yao N., 2014. Preparation and Characterisation of Andrographolide Niosomes and its Anti-hepatocellular carcinoma activity. *J Microencapsul*, 31 (4): 307–316.
- Turnidge J., Paterson D.L., 2007. Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clin Microbiol Rev.*, 20 (3): 391–408.
- Uchegbu I.F., 2005. Synthetic Surfactant Vesicles Niosomes and Other Non-Phospholipid Vesicular Systems. Harwood Academic Publishers, Australia. 272.
- Uchegbu I.F., Florence A.T., 1995. Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes): Physical And Pharmaceutical Chemistry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 58 (1): 1–55.
- Uchegbu I.F., Vyas S.P., 1998. Non-ionic Surfactant Based Vesicles (Niosomes) in Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 172 (1-2): 33–70.
- van Hal D.A., Bouwstra J.A., van Rensen A., Jeremiasse E., de Vringer T., Junginger H.E., 1996. Preparation and Characterization of Nonionic Surfactant Vesicles. *Journal Of Colloid and Interface Science*, 178: 263–273.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D., 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10): 4113–4117.
- Verma S., Singh S.K., Syan N., Mathur P., Valecha V., 2010. Nanoparticle Vesicular Systems: A Versatile Tool For Drug Delivery. *J. Chem. Pharm. Res*, 2 (2): 496–509.
- Vinha A.F., Ferreres F., Silva B.M., Valentão P., Gonçalves A., Pereira J.A., Oliveira M.B., Seabra R.M., Andrade P.B., 2005. Phenolic Profiles of Portuguese Olive Fruits (*Olea europaea* L.): Influences of Cultivar and Geographical Origin. *Food Chemistry*, 89 (4): 561–568.
- Visioli F., Bellomo G., Galli C., 1998. Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247 (1): 60–64.
- Waddad A.Y., Abbad S., Yu F., Munyendo W.L.L., Wang J., Lv H., Zhou J., 2013. Formulation, Characterization and Pharmacokinetics of Morin Hydrate Niosomes

- Prepared from Various Non-ionic Surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 456 (2): 446–458.
- Waterman E., Lockwood B., 2007. Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 12 (4): 331–342.
- Weiss J., Takhistov P., McClements D.J., 2006. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71 (9): 107–116.
- Yang D., Gan L.J., Shin J.A., Kim S., Hong S.T., Park S.H., Lee J.H., Lee K.T., 2013. Antioxidative Activities of Ginkgo Biloba Extract on Oil/Water Emulsion System Prepared from an Enzymatically Modified Lipid Containing Alpha-Linolenic Acid. *Journal of Food Science*, 78 (1): C43–C49.
- Yoshida H., Lehr C.-M., Kok W., Junginger H.E., Verhoef J.C., Bouwstra J.A., 1992. Niosomes for oral delivery of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*, 21 (3): 145–154.
- Yoshioka T., Sternberg B., Florence A.T., 1994. Preparation and Properties of Vesicles (Niosomes) of Sorbitan Monoesters (Span 20,40,60 and 80) and a Sorbitan Triester (Span 85). *International Journal of Pharmaceutics*, 105: 1–6.
- Yu H., Li J., Shi K., Huang Q., 2011. Structure of Modified E-polylysine Micelles and Their Application in Improving Cellular Antioxidant Activity of Curcuminoids. *Food & Function*, 2 (7): 373–380.
- Zhigaltsev I.V., Kaplun A.P., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Kolomeichuk S.N., Shvets V.I., Yurasov V.V., 2001. Liposomes Containing Dopamine Entrapped in Response to Transmembrane Ammonium Sulfate Gradient as Carrier System For Dopamine Delivery into the Brain of Parkinsonian Mice. *Journal of Liposome Research*, 11 (1): 55–71.
- Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A., 2009. Liposome Drugs' Loading Efficiency: A Working Model Based on Loading Conditions and Drug's Physicochemical Properties. *Journal of Controlled Release*, 139 (1): 73–80.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Aygöl CAN

Doğum Yeri : Çanakkale

Doğum Tarihi : 18.09.1990

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2015-2017)

Erasmus + : Università degli Studi della Basilicata
SAFE (2016-2017)

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği (2008-2012)

Ön Lisans: Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi,
Dış Ticaret (2010-2013)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce (İleri), İtalyanca (Başlangıç)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Tolve, R., Condelli, N., Can, A., Tchuenbou-Magaia, F. L., 2017. Development and Characterization of Phytosterols-enriched Oil Microcapsules for Foodstuff Application. Food and Bioprocess Technology (In Review)

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

Yıldız Tiryaki, G., Yılmaz Ö. ve Can, A., 2016. Geleneksel Laktofermente Rasol

İçeceğinin Biyoaktif Bileşenlerinin Saptanması. Poster Bildiri. Gıda Mühendisliği
7. Öğrenci Kongresi, 8-9 Nisan 2016, Gaziantep.

Can, A., Uysal Pala, Ç., 2016. Oleuropein Content and Antioxidant Activity of Herbal Tea Made From Olive Leaves of Fourteen Different Cultivars. Poster Presentation. 10th Aegean Analytical Chemistry Days, September 29-October 2, 2016, PP.219-219. Canakkale.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Aydoğan Restaurant & Catering,
Kalite Kontrol Mühendisi, (08.2012 - 02.2013)

Royal Foods A.Ş.,
Kalite Kontrol Mühendisi, (07.2013 - 10.2014)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : aygul.can@hotmail.com

