

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI  
2024-DR-07

**SIĞLA (*Liquidambar orientalis*) YAĞININ  
FARKLI POLİMERLERLE NANOENKAPSÜLASYONU**

**Eda ÜLKERYILDIZ BALÇIK**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Hilal ŞAHİN NADEEM**

Bu tez TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 221O107 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2024**



## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Doktora Programı öğrencisi Eda ÜLKERYILDIZ BALÇIK tarafından hazırlanan “SIĞLA (*Liquidambar orientalis*) YAĞININ FARKLI POLİMERLERLE NANOENKAPSÜLASYONU” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/02/2024

### Jüri Üyeleri

ONAY:

|        |                                     |       |
|--------|-------------------------------------|-------|
| Başkan | Prof. Dr. Hilal ŞAHİN NADEEM        |       |
| :      | (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi) | ..... |
| Üye    | Doç. Dr. Mehmet KOÇ                 |       |
| :      | (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi) | ..... |
| Üye    | Doç. Dr. Olcay BOYACIOĞLU           |       |
| :      | (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi) | ..... |
| Üye    | Prof. Dr. Numan HODA                |       |
| :      | (Akdeniz Üniversitesi)              | ..... |
| Üye    | Doç. Dr. Mehmet TORUN               |       |
| :      | (Akdeniz Üniversitesi)              | ..... |

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Fen Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa SÜRMEN

Enstitü Müdürü



## TEŞEKKÜR

Doktora araştırması süresince her zaman akademik bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hilal ŞAHİN NADEEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımı titizlikle takip ederek, yorumlarıyla tezimin daha iyi olmasına önemli katkı sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet KOÇ'a çok teşekkür ederim. Çalışmaların başından sonuna kadar bütün aşamalarında büyük bir özveriyle yer alan, bilimsel katkılarıyla yoluma ışık tutan Sayın Doç. Dr. Mehmet TORUN ve değerli eşi Sayın Dr.Öğr.Üyesi Ferhan BALCI TORUN'a çok teşekkür ederim. Tez savunma jürisinde yer alan Sayın Prof. Dr. Numan HODA ve Sayın Doç. Dr. Olcay BOYACIOĞLU hocalarıma önerileri ve değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 221O107 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Sağlamış olduğu maddi destekten dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince 100/2000 YÖK Doktora Burs Programı ile sağlamış olduğu maddi destek için Yükseköğretim Kurumu Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Dilara KONUK TAKMA'ya ve çalışmalarım süresince analizlerin yürütülmesinde sağlamış oldukları desteklerden dolayı Keziban Kübra GÜNGÖR ve Gülderen COŞGUN'a çok teşekkür ederim.

Daha dünyaya gelmeden önce doktora çalışmasının planlanması, çalışma süreci ve yazımına kadar bütün aşamalarında benimle birlikte olan, hayatı tanımaya başladığı ilk zamanlarında çalışmalarına izin vererek en büyük özveriyi sağlayan canım kızım Yaz'a sonsuz sevgilerimi sunuyorum. Çalışma süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, en büyük motivasyonu sağlayan ve her zaman yanımda olan eşim Onur Yazdan BALÇIK'a teşekkür ediyorum.

Son olarak, hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, üzerimde büyük emeği olan annem Şerife ÜLKERYILDIZ, babam Şevket ÜLKERYILDIZ ve ablam Evren ÜLKERYILDIZ'a sonsuz teşekkür ederim.



## BİLİMSEL ETİK BEYANI

“SİĞLA (*Liquidambar orientalis*) YAĞININ FARKLI POLİMERLERLE NANOENKAPSÜLASYONU” başlıklı Doktora tezimdaki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Eda ÜLKERYILDIZ BALÇIK

08/02/2024



# İÇİNDEKİLER

|                                                        |      |
|--------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                    | i    |
| TEŞEKKÜR .....                                         | iii  |
| BİLİMSEL ETİK BEYANI .....                             | v    |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                  | xi   |
| KISALTMALAR DİZİNİ .....                               | xiii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                  | xv   |
| RESİMLER DİZİNİ .....                                  | xix  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                 | xx   |
| ÖZET .....                                             | xxv  |
| ABSTRACT .....                                         | xxix |
| 1. GİRİŞ.....                                          | 1    |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ.....                                | 3    |
| 2.1. Sığla Yağı (Balsamı) .....                        | 3    |
| 2.2. Sığla Yağının Fiziksel Özellikleri .....          | 4    |
| 2.3. Sığla Yağının Kimyasal Özellikleri.....           | 5    |
| 2.4. Sığla Yağının Biyolojik Aktivite Özellikleri..... | 7    |
| 2.5. Sığla Yağı Standardı.....                         | 8    |
| 2.6. Sığla Yağının Sağlık Açısından Önemi.....         | 9    |
| 2.7. Sığla Yağı Kullanım Dozu .....                    | 10   |
| 2.8. Sığla Yağının Kullanım Alanları.....              | 12   |
| 2.9. Nanoenkapsülasyon Teknolojisi.....                | 13   |
| 2.9.1. Gıda Endüstrisinde Nanoenkapsülasyon .....      | 14   |
| 2.9.2. Bitkisel Yağların Nanoenkapsülasyonu .....      | 15   |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.10. Nanoçöktürme Yöntemi .....                                                                             | 17 |
| 2.11. Flaş Nanoçöktürme Yöntemi.....                                                                         | 24 |
| 2.12. Koloidal Nanopartikül Stabilizasyonu .....                                                             | 27 |
| 2.12.1. Fiziksel Stabilizasyon.....                                                                          | 27 |
| 2.12.2. Kimyasal Stabilizasyon .....                                                                         | 27 |
| 2.13. Nanopartikül Kurutma Yöntemleri.....                                                                   | 28 |
| 2.14. Nanopartikül Karakterizasyonu.....                                                                     | 30 |
| 2.15. Nanopartikül Güvenliği ve Toksisitesi.....                                                             | 31 |
| 2.16. Peptik/Gastrik Ülser & Kanser .....                                                                    | 33 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                                                  | 39 |
| 3.1. Materyal.....                                                                                           | 39 |
| 3.1.1. Sığla Balsamı Önışlemi .....                                                                          | 40 |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                            | 41 |
| 3.2.1. Basit Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi.....                                              | 41 |
| 3.2.2. Flaş Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi .....                                              | 43 |
| 3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....                                                                 | 45 |
| 3.4. Morfolojik Analizler.....                                                                               | 45 |
| 3.4.1. Partikül Boyutu/Dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ve Zeta Potansiyeli, $\zeta$ (mV) Ölçümü ..... | 45 |
| 3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....                                                       | 45 |
| 3.4.3. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi .....                                       | 45 |
| 3.5. Fiziksel Analizler.....                                                                                 | 46 |
| 3.5.1. Renk.....                                                                                             | 46 |
| 3.5.2. Nem .....                                                                                             | 46 |
| 3.5.3. Su Aktivitesi .....                                                                                   | 46 |
| 3.5.4. Yığın/Sıkıştırılmış Yoğunluk .....                                                                    | 47 |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.5. Çözünürlük .....                                                                                  | 47 |
| 3.5.6. Ürün verimi .....                                                                                 | 47 |
| 3.6. Kimyasal Analizler .....                                                                            | 48 |
| 3.6.1. Enkapsülasyon Etkinliği .....                                                                     | 48 |
| 3.6.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı .....                                                                | 49 |
| 3.6.3. Antioksidan Aktivite Tayini .....                                                                 | 49 |
| 3.6.4. <i>İn Vitro</i> Sindirim Analizi .....                                                            | 50 |
| 3.7. Biyolojik Aktivite Özellikleri .....                                                                | 51 |
| 3.7.1. Anti Ülseratif Etki .....                                                                         | 51 |
| 3.7.2. Anti Karsinojenik Etki .....                                                                      | 52 |
| 3.8. Duyusal Analiz .....                                                                                | 52 |
| 3.9. İstatistiksel Analiz ve Optimizasyon .....                                                          | 53 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                            | 55 |
| 4.1. Sığla Yağı Saflaştırma Önüşlemi .....                                                               | 55 |
| 4.2. Zein Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu ve Optimizasyonu .....                                    | 56 |
| 4.3. Sığla Yağı Dolgulu Zein Nanopartikül Üretim Yöntemlerinin ve Proses<br>Değişkenlerinin Etkisi ..... | 63 |
| 4.3.1. Partikül Boyutu .....                                                                             | 63 |
| 4.3.2. Polidispersite İndeksi .....                                                                      | 68 |
| 4.3.3. Geçirgenlik (Transmittans) Değeri .....                                                           | 70 |
| 4.3.4. Zeta Potansiyeli ( $\zeta$ ) .....                                                                | 73 |
| 4.3.5. Enkapsülasyon Etkinliği .....                                                                     | 76 |
| 4.3.6. <i>İn Vitro</i> Sindirim Analizi .....                                                            | 79 |
| 4.3.6.1. <i>İn Vitro</i> Ağız Sindirim Ortamı Sığla Yağı Salınımı .....                                  | 80 |
| 4.3.6.2. <i>İn vitro</i> Mide Ortamı Sığla Yağı Salınımı .....                                           | 83 |
| 4.4. Optimizasyon Çalışması ve Sonuçların Deneysel Doğrulaması .....                                     | 85 |

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5. Kolloidal Zein Nanopartiküllerinin Stabilizasyon Çalışması .....              | 91  |
| 4.6. Poli ε-kaprolakton (PCL) Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu..... | 95  |
| 4.7. <i>İn vitro</i> Gastrik Ortamda Sığıla Yağı (SL) Salınım Profili.....         | 103 |
| 4.8. Nanopartikül Morfolojisi.....                                                 | 105 |
| 4.9. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) .....                       | 110 |
| 4.10. Fiziksel Analiz Sonuçları .....                                              | 113 |
| 4.11. Kimyasal Analiz Sonuçları.....                                               | 118 |
| 4.12. Biyolojik Aktivite Özellikleri.....                                          | 124 |
| 4.12.1. Anti Ülseratif Etki .....                                                  | 125 |
| 4.12.2. Anti Kanseri Etkisi .....                                                  | 126 |
| 4.13. Duyusal Analiz .....                                                         | 130 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                         | 134 |
| KAYNAKLAR.....                                                                     | 138 |
| ÖZ GEÇMİŞ.....                                                                     | 155 |

## SİMGELER DİZİNİ

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| $\alpha$           | : Alfa             |
| $\pm$              | : Artı-eksi        |
| $\beta$            | : Beta             |
| $>$                | : Büyüktür         |
| $\text{cm}^{-1}$   | : Dalgaboyu        |
| $<$                | : Küçüktür         |
| $\text{M}\Omega$   | : Milyohm          |
| $^{\circ}\text{C}$ | : Santigrat        |
| $\%$               | : Yüzde oran       |
| $\zeta$            | : Zeta potansiyeli |



## KISALTMALAR DİZİNİ

|                                     |                                             |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>ANOVA</b>                        | : Varyans analizi                           |
| <b>BN</b>                           | : Basit nanoçöktürme                        |
| <b>C.V.</b>                         | : Varyasyon katsayısı                       |
| <b>dk</b>                           | : Dakika                                    |
| <b>DPPH</b>                         | : 2,2-difenil1-pikrilhidrazil               |
| <b>DLS</b>                          | : Dinamik ışık saçılımı                     |
| <b>EE</b>                           | : Enkapsülasyon etkinliği                   |
| <b>FITR</b>                         | : Fourier Transform Infrared Spektrometresi |
| <b>FN</b>                           | : Flaş nanoçöktürme                         |
| <b>GAE</b>                          | : Gallik asit eşdeğeri                      |
| <b>HPLC</b>                         | : Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi       |
| <b>µL</b>                           | : Mikrolitre                                |
| <b>mV</b>                           | : Milivolt                                  |
| <b>nm</b>                           | : Nanometre                                 |
| <b>PCL</b>                          | : Poli ε-kaprolakton                        |
| <b>PTFE</b>                         | : Politetrafloretilen                       |
| <b>PVA</b>                          | : Polivinil alkol                           |
| <b>R<sup>2</sup><sub>adj.</sub></b> | : Düzeltilmiş regresyon katsayısı           |
| <b>R<sup>2</sup></b>                | : Regresyon katsayısı                       |
| <b>rpm</b>                          | : Devir/dakika                              |
| <b>SD</b>                           | : Serbestlik derecesi                       |
| <b>SL</b>                           | : Sığla yağı (Styrax Liquidus)              |
| <b>SL-PCL-NP</b>                    | : Sığla yağı dolgulu PCL nanopartikülleri   |
| <b>SL-ZNP</b>                       | : Sığla yağı dolgulu zein nanopartikülleri  |
| <b>SCJ</b>                          | : Sınırlı çarpan jet                        |
| <b>TE</b>                           | : Troloks eşdeğeri                          |

|                        |                                           |
|------------------------|-------------------------------------------|
| <b>TEM</b>             | : Taramalı elektron mikroskobu            |
| <b>TFM</b>             | : Toplam fenolik madde                    |
| <b>TSA</b>             | : Trans sinnamik asit                     |
| <b>v/v</b>             | : Hacim/hacim                             |
| <b>KM</b>              | : Kuru madde                              |
| <b>w/v</b>             | : Kütle/hacim                             |
| <b>kV</b>              | : Kilovolt                                |
| <b>UV</b>              | : Ultraviyole                             |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | : Yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu |
| <b>ZNP</b>             | : Zein nanopartikülleri                   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Sığla yağı majör kimyasal bileşenlerinin moleküler yapıları(Teker, 2013).....                                                                                                                                                                         | 6  |
| <b>Şekil 2.2.</b> La Mer tarafından açıklanan nanopartikül çekirdeklenme mekanizması (Khan vd.,2019) .....                                                                                                                                                              | 18 |
| <b>Şekil 2.3.</b> Üçlü hidrofobik çözünen(polimer)/çözücü/su sisteminin faz diyagramı ve sıvı-sıvı çekirdeklenme sürecinin veya uzo bölgesinin şematik açıklaması (Botet,2012) .....                                                                                    | 23 |
| <b>Şekil 2.4.</b> Nanoçöktürme yöntemi ile nanoparçacıkların oluşum mekanizmasının şematik gösterimi. ....                                                                                                                                                              | 24 |
| <b>Şekil 2.5.</b> Türbülanslı koşulları oluşturan çeşitli karıştırıcı modelleri (a) Sınırlı girişli jet akışlı karıştırıcı-Confined impinging jets mixer-CIJM (iki girişli), (b) Çok girişli vorteks karıştırıcı-Multi-inlet vortex mixture- MIVM (dört girişli)) ..... | 25 |
| <b>Şekil 2.6.</b> Dünya genelinde, en yaygın 10 kanser türü için 2020 yılında tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı. Pasta grafiğın alanı toplam vaka veya ölüm sayısının oranını yansıtmaktadır (Sung vd.,2021) .....                                                | 35 |
| <b>Şekil 2.7.</b> Dünya genelinde ve Türkiyede görülen en yaygın 10 kanser türü için 2020 yılına ait tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı (GCO,2021) .....                                                                                                           | 37 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Jet akışlı karıştırma sağlayan sınırlı jet çarpan (SÇJ) karıştırma (confined impinging jets mixer-CIJM) deneysel aparatı ve boyutları .....                                                                                                           | 40 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi deneysel düzeneği. ....                                                                                                                                                                                                    | 42 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi deneysel düzeneği.....                                                                                                                                                                                                      | 43 |
| <b>Şekil 4.1.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi deneme desenine göre üretilen sığla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değişim grafiği. ....                                                                                                         | 61 |
| <b>Şekil 4.2.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi deneme desenine göre üretilen sığla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değişim grafiği. ....                                                                                                          | 61 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.3.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri. ....                                            | 67  |
| <b>Şekil 4.4.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin polidispersite indeksi (%) üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.....                                  | 70  |
| <b>Şekil 4.5.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin geçirgenlik (%) değerleri üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.....                                   | 73  |
| <b>Şekil 4.6.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin zeta potansiyeli (mV) üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.....                                       | 76  |
| <b>Şekil 4.7.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin enkapsülasyon etkinliği üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.....                                     | 79  |
| <b>Şekil 4.8.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin <i>in vitro</i> ağız sindirim ortamında sıgla yağı salınımı üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri..... | 82  |
| <b>Şekil 4.9.</b> Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin <i>in vitro</i> mide sindirim ortamında sıgla yağı salınımı proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri. ....        | 85  |
| <b>Şekil 4.10.</b> Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği. ....                                                                                     | 92  |
| <b>Şekil 4.11.</b> Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ZNP'nin zeta potansiyeli ve transmittans (geçirgenlik) değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği. ....                                                                                | 93  |
| <b>Şekil 4.12.</b> Optimum sıgla yağı dolgulu zein ve PCL nanopartiküllerinin <i>in vitro</i> gastrik ortamda zamana bağlı salınım oranları (%) ve kümülatif salınım (%) profilleri .....                                                                      | 104 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgusuz/dolgulu ZNP'nin SEM görüntüleri.....                                                                                                                                                         | 106 |

|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.14.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu ZNP'nin SEM görüntüleri.....                                            | 107 |
| <b>Şekil 4.15.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin SEM görüntüleri.....                                        | 108 |
| <b>Şekil 4.16.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin SEM görüntüleri.....                                         | 109 |
| <b>Şekil 4.17.</b> Basit ve Flaş nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu ZNP'nin FITR spektrumu. ....                                   | 111 |
| <b>Şekil 4.18.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu PCL nanopartiküllerinin FITR spektrumu .....                           | 112 |
| <b>Şekil 4.19.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu PCL nanopartiküllerinin FITR spektrumu .....                            | 112 |
| <b>Şekil 4.20.</b> Ham sığla yağının PC3 hücreleri üzerine 24-48 saat muameleye ait XTT sitotoksite testi sonuçları.....                         | 129 |
| <b>Şekil 4.21.</b> Ham sığla yağının LNCaP hücreleri üzerine 24-48 saat muameleye ait XTT sitotoksite testi sonuçları. ....                      | 130 |
| <b>Şekil 4.22.</b> Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile sığla yağı dolgulu optimum zein nanopartikül tozlarının duyusal analiz grafiği..... | 133 |



## RESİMLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Resim 2.1.</b> Geleneksel yöntemle Anadolu Sığla ağacından sığla yağı üretim aşamaları.(1-kabuk sıyırma, 2-kabuklar, 3-damar açma, 4-sur (yara kabuğu), 5-kara kap (sonradan çıkan fazla yağı alma), 6-kaynatma (kabuk-yağ ayrılması), 7-presleme (buhur eldesi), 8-dinlendirme, 9-kaplara doldurma). .... | 4   |
| <b>Resim 4.1.</b> Sığla balsamı saflaştırma önişlemi sürecinde: (a) ham sığla balsamı, (b) dipte safsızlıklar, (c) yağ-çözücü fazları ve (d) saflaştırma önişlemi sonrası sığla yağı. ....                                                                                                                    | 55  |
| <b>Resim 4.2.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu PCL koloidal dispersiyonların görünümü. ....                                                                                                                                                                                         | 96  |
| <b>Resim 4.3.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu PCL koloidal dispersiyonların görünümü. ....                                                                                                                                                                                          | 100 |
| <b>Resim 4.4.</b> Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile sığla yağı dolgulu optimum zein ve PCL nanopartikül tozlarının görünümü. ....                                                                                                                                                                     | 113 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> Bitkisel yağ ve lipofilik bileşenlerin nanoçöktürme yöntemi ile nanoenkapsülasyon çalışmaları.....                                            | 21 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Basit nanoçöktürme optimal (custom) dizayn için seçilen bağımsız değişkenler ve seviyeleri.....                                               | 42 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Flaş nanoçöktürme optimal (custom) dizayn için seçilen bağımsız değişkenler ve seviyeleri.....                                                | 44 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Ham sıgla yağı ve saflaştırılmış sıgla yağının kimyasal analiz sonuçları..                                                                    | 56 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Basit nanoçöktürme sıgla dolugulu zein nanopartikülleri üretimi deneme deseni (optimal custom design).....                                    | 57 |
| <b>Çizelge 4.3.</b> Flaş nanoçöktürme sıgla dolugulu zein nanopartikülleri üretimi deneme deseni (optimal custom design).....                                     | 58 |
| <b>Çizelge 4.4.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ve dolgusuz ZNP'nin optimal (custom) deneme deseni izlenerek elde edilen deneysel sonuçlar..... | 59 |
| <b>Çizelge 4.5.</b> Flaş Nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ve dolgusuz ZNP'nin optimal (custom) deneme deseni izlenerek elde edilen deneysel sonuçlar.....  | 60 |
| <b>Çizelge 4.6.</b> Statik <i>in vitro</i> sindirim analizinde ağız ve mide ortamlarında ZNP'nin sıgla yağı salınımları deneysel sonuçları.....                   | 62 |
| <b>Çizelge 4.7.</b> Basit nanoçöktürme yönteminde modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....                                           | 63 |
| <b>Çizelge 4.8.</b> Flaş nanoçöktürme yönteminde modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....                                            | 63 |
| <b>Çizelge 4.9.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin partikül boyutu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....           | 65 |
| <b>Çizelge 4.10.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin partikül boyutu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....           | 66 |

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.11.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin polidispersite indeksi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....                                       | 68 |
| <b>Çizelge 4.12.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin polidispersite indeksi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....                                        | 69 |
| <b>Çizelge 4.13.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin geçirgenlik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....                                        | 71 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin geçirgenlik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....                                         | 72 |
| <b>Çizelge 4.15.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin zeta potansiyeli üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....                                             | 74 |
| <b>Çizelge 4.16.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin zeta potansiyeli üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....                                              | 75 |
| <b>Çizelge 4.17.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin enkapsülasyon etkinliği üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu. ....                                     | 77 |
| <b>Çizelge 4.18.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin enkapsülasyon etkinliği üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu. ....                                      | 78 |
| <b>Çizelge 4.19.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin <i>in vitro</i> ağız sindirim ortamında sıgla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....  | 80 |
| <b>Çizelge 4.20.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin <i>in vitro</i> ağız sindirim ortamında sıgla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....   | 81 |
| <b>Çizelge 4.21.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin <i>in vitro</i> mide sindirim ortamında sıgla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu. .... | 83 |
| <b>Çizelge 4.22.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin <i>in vitro</i> mide sindirim ortamında sıgla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....   | 84 |
| <b>Çizelge 4.23.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi için desirability fonksiyonu yaklaşımıyla belirlenen optimum noktalar. ....                                                                           | 86 |

|                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 4.24.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi için optimum nokta doğrulama denemeleri sonuçları .....                                                                                                                              | 87  |
| <b>Çizelge 4.25.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi için Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması. ....                                                                          | 87  |
| <b>Çizelge 4.26.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi için desirability fonksiyonu yaklaşımıyla belirlenen optimum noktalar. ....                                                                                                           | 89  |
| <b>Çizelge 4.27.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi için optimum nokta doğrulama denemeleri sonuçları .....                                                                                                                               | 90  |
| <b>Çizelge 4.28.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi için Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması. ....                                                                           | 90  |
| <b>Çizelge 4.29.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin ürün özellikleri üzerine sıgla yağı oranı etkisinin deneysel sonuçları. ....                                                  | 97  |
| <b>Çizelge 4.30.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin <i>in vitro</i> sindirim ortamlarında salınımları üzerine sıgla yağı oranı etkisinin deneysel sonuçları.....                  | 97  |
| <b>Çizelge 4.31.</b> Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin deneysel verilerine ait varyans analiz sonuçları..                                                                            | 97  |
| <b>Çizelge 4.32.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin ürün özellikleri üzerine sıgla yağı oranı etkisinin deneysel sonuçları. ....                                                   | 101 |
| <b>Çizelge 4.33.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin <i>in vitro</i> sindirim ortamında Trans-sinamik asit (TSA) salınımları üzerine SL oranının etkisinin deneysel sonuçları. .... | 101 |
| <b>Çizelge 4.34.</b> Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin deneysel verilerine ait varyans analiz sonuçları.....                                                                          | 101 |
| <b>Çizelge 4.35.</b> Sıgla yağı ve basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile elde edilen optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin fiziksel analiz sonuçları. ....                                                                     | 114 |
| <b>Çizelge 4.36.</b> L*, a* , b*, Chroma ve Hue değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. ....                                                                                                     | 115 |

|                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 4.37.</b> L*, a* , b*, Chroma ve Hue değerlerinin değerlerine ait varyans analiz sonuçları. ....                                                                                            | 115 |
| <b>Çizelge 4.38.</b> Nem ve su aktivitesi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. ....                                                                             | 116 |
| <b>Çizelge 4.39.</b> Nem ve su aktivitesi değerlerine ait varyans analiz sonuçları. ....                                                                                                               | 116 |
| <b>Çizelge 4.40.</b> Yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve Carr Index değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. ....                                             | 117 |
| <b>Çizelge 4.41.</b> Yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve Carr Index değerlerine ait varyans analiz sonuçları. ....                                                                               | 118 |
| <b>Çizelge 4.42.</b> Sığla yağı ve optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin kimyasal analiz sonuçları. ....                                                                                             | 119 |
| <b>Çizelge 4.43.</b> Optimum nanopartiküllerin toplam fenolik madde (TFM), antioksidan ve trans-sinamik asit (TSA) değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. ....    | 121 |
| <b>Çizelge 4.44.</b> Optimum nanopartiküllerin toplam fenolik madde (TFM), antioksidan ve trans-sinamik asit (TSA) değerlerine ait varyans analiz sonuçları. ....                                      | 121 |
| <b>Çizelge 4.45.</b> Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. ....              | 122 |
| <b>Çizelge 4.46.</b> Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TFM miktarı değerlerine ait varyans analiz sonuçları. ....                                                | 122 |
| <b>Çizelge 4.47.</b> Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen antioksidan kapasiteleri değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. .... | 123 |
| <b>Çizelge 4.48.</b> Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen antioksidan kapasiteleri değerlerine ait varyans analiz sonuçları. ....                                   | 123 |
| <b>Çizelge 4.49.</b> Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TSA değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları. ....                      | 124 |

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 4.50.</b> Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TSA değerlerine ait varyans analiz sonuçları..... | 124 |
| <b>Çizelge 4.51.</b> Ham sığla yağı ve optimum nanopartiküllerin antiülser etkisi. ....                                                        | 126 |
| <b>Çizelge 4.52.</b> Sığla yağının 24 ve 48 saatlik PC3 ve LNCaP hücre hattında yüzde canlılık değerleri üzerine etkileri. ....                | 128 |
| <b>Çizelge 4.53.</b> Zein nanopartikül tozları duyuşal değerdendirme formu.....                                                                | 131 |
| <b>Çizelge 4.54.</b> Basit nanoçöktürme (BN) ve flaş nanoçöktürme (FN) yöntemi ile elde edilen optimum ZNP'nin duyuşal analiz sonuçları.....   | 132 |
| <b>Çizelge 4.55.</b> Basit nanoçöktürme (BN) ve flaş nanoçöktürme (FN) yöntemi ile elde edilen optimum ZNP'nin varyans analiz sonuçları.....   | 132 |

## ÖZET

### SİĞLA (*Liquidambar orientalis*) YAĞININ FARKLI POLİMERLERLE NANOENKAPSÜLASYONU

Ülkeryıldız Balçık E., Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri  
Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr.  
Hilal Şahin Nadeem, Aydın, 2024.

**Amaç:** Bu tez çalışması kapsamında, sığla yağının enkapsüle edildiği zein ve poli-ε-kaprolakton (PCL) nanopartiküllerinin sentezlenmesi, karakterize edilmesi, biyoyararlanımın incelenmesi ve nanopartiküllerin anti-ülserojenik etkileri değerlendirilerek duyuşal olarak tüketilebilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Tez çalışması, ham sığla balsamının önişlemden geçirilerek nanoenkapsülasyon çalışmalarına uygun hale getirildikten sonra, basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile sığla yağı dolguşu zein ve PCL nanopartiküllerinin uygun üretim koşullarının belirlenmesi (I), zein nanopartiküllerinin proses koşullarının optimizasyonu (II), optimum noktada üretilen zein ve PCL nanopartiküllerinin morfolojik, fiziksel, kimyasal karakterizasyonları ve statik *in vitro* sindirim ortamlarında analizleri (III), optimum noktada üretilen zein ve PCL nanopartiküllerinin anti-ülser etkilerinin belirlenmesi (IV) ve optimum zein nanopartiküllerinin duyuşal olarak incelenmesi (V) olmak üzere beş aşamada gerçekleştirilmiştir.

Sığla yağı dolguşu zein ve PCL nanopartikülleri basit nanoçöktürme ve flaş nanoçöktürme yöntemleri kullanılarak sentezlenmiştir. Zein nanopartiküllerinin partikül boyutu, geçirgenlik, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli değerleri, enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* sindirim ortamında salınım oranları analiz edilmiş ve optimum nanopartikül üretim koşulları belirlenmiştir. PCL nanopartikülleri üretiminde farklı sığla yağı oranları çalışılmış ve her bir yöntem için ayrı üretim koşulları belirlenerek uygun sığla yağı oranlarında optimum üretimler gerçekleştirilmiştir. Optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin fiziksel (renk, nem, su aktivitesi, suda çözünürlük, yığın-sıkıştırılmış yoğunluk, akabilirlik), kimyasal (toplam fenolik madde miktarı, antioksidan

kapasitesi, trans-sinamik asit miktarı), *in vitro* sindirim ortamında sıgla yağı salınımı (ağız, mide ve bağırsak ortamı) ve biyolojik aktivite (anti-ülseratif etki) analizleri yapılmıştır. Ham sıgla yağının anti-kanser etkisi insan prostat kanser hücreleri (PC3 ve LNCaP) üzerinde incelenmiştir. Optimum koşullarda üretilen sıgla yağı yüklü zein nanopartikülleri duyusal olarak incelenmiştir.

**Bulgular:** Basit nanoçöktürme (BN) ve flaş nanoçöktürme (FN) yöntemleri kullanılarak elde edilen sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin partikül boyutları sırasıyla 140,31 ile 427,40 nm ve 151,00 ile 233,95 nm olarak ölçülmüş ve dar bir boyut aralığında (PDI: %0,1-0,2) dağılım göstermiştir. Zein nanopartikül üretiminde en yüksek enkapsülasyon etkinliği ve ürün verimi sırasıyla %95,81 ve %98,90 olarak flaş nanoçöktürme yöntemiyle elde edilmiştir. Zein nanopartiküllerinin statik *in vitro* ağız ortamı sıgla yağı salınım yüzdeleri BN yöntemi ile üretilen örneklerde (ortalama % 7,41 ve en düşük %1,22), FN yöntemi ile üretilen örneklere (ortalama %11 ve en düşük %2,65) göre daha düşük oranda tespit edilmiştir. Zein nanopartiküllerinin statik *in vitro* mide ortamı sıgla yağı salınım yüzdeleri FN yöntemi ile üretilen örneklerde (ortalama %69 ve en yüksek %90,58) BN yöntemi ile üretilen örneklere (ortalama %50 ve en yüksek %94,77) göre daha yüksek bulunmuştur. Kolloidal zein nanopartiküllerinin stabiliteelerini korudukları ve FN yöntemi ile üretilen nanopartiküllerin BN yöntemi ile üretilenlere göre daha kararlı oldukları tespit edilmiştir. Duyusal analizlerde FN yöntemi ile üretilen optimum tozların renk, topaklanma ve sıgla yağı lezzet yoğunluğu açısından daha tüketilebilir bulunduğu görülmüştür. Sıgla yağı dolgulu stabil zein nanopartiküllerinin üretimi için FN yöntemi daha uygun bulunmuştur.

Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartikülleri üretiminde BN ve FN yöntemleri için farklı üretim koşullarında sırasıyla maksimum %2 ve %3 oranlarında sıgla yağı dolgulu nanopartikül tozları üretilmiştir. Yüksek sıgla yağı oranlarında her iki yöntem için de enkapsülasyon etkinliği ve ürün verimi dramatik olarak düşmüştür. BN yöntemi ile üretilen PCL nanopartiküllerinin boyutları 258,67 nm ile 510,00 nm aralığında değişim gösterirken, FN yöntemi ile üretilen PCL nanopartiküllerinin boyutları 225,88 nm ile 389,98 nm aralığında değişim göstermiştir. BN yöntemi ile üretilen PCL nanopartiküllerinin statik *in vitro* sindirim ortamları analizinde sıgla yağı salınımları ağız ortamında minimum %1,59 ve mide ortamında maksimum %69,03 aralığında iken FN yöntemi ile üretilen nanopartiküllerin salınımları ağız ortamında minimum %2,88 ve

mide ortamında maksimum %75,00 aralığında daha yüksek bulunmuştur. FN yöntemi sığla yağı dolgulu PCL nanopartikül üretimi için de daha avantajlı bulunmuştur.

Sığla yağı nanoenkapsülasyonu için uygun olan materyal ve yöntem seçimi için optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin *in vitro* gastrik salınım profili zamana bağlı olarak incelenmiş, ilk 15 dk'da %20 olarak en düşük patlama salınımı ve uzun süreli yavaş salınım profili gösteren materyal PCL, yöntem ise flaş nanoçöktürme olarak belirlenmiştir. FN yöntemi ile üretilen sığla yağı dolgulu zein ve PCL nanopartikülleri birbirleriyle benzer fiziksel özellikler göstermiş, kimyasal özellikler ve *in vitro* sindirim ortamları salınım özellikleri ise yöntem ve materyal türünden etkilenecek farklı bulunmuştur. Sığla yağı ve elde edilen optimum nanopartiküllerin anti-ülseratif etkileri incelenmiş ve BN-PCL nanopartikülleri en yüksek üreaz enzim inhibisyonu göstermiştir. Ham sığla yağının anti-karsinojenik etkisi PC3 ve LNCaP insan prostat kanseri hücre hatları üzerinde farklı dozlarda incelenmiş ve IC<sub>50</sub> değerleri 48 saatlik muamele sonunda sırasıyla 198,79 µg/mL ve 59,89 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Tez çalışması kapsamında, yüksek biyoaktif özelliklere sahip sığla yağının zein ve PCL materyalleri kullanılarak BN ve FN yöntemleri ile nanoenkapsülasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sığla yağının zein ve PCL taşıyıcı nanopartiküllerine yüklenmesi ve kararlı nanopartiküllerin eldesi düşük maliyetli basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile tek adımda ve hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Optimum noktada elde edilen sığla yağı yüklü toz nanopartiküllerinin *in vitro* sindirim analizinde ağız ortamında düşük, mide ve bağırsak ortamlarında ise yüksek salınım özellikleri göstermeleri, düşük boyutları sayesinde hücre içine kolaylıkla geçmelerinin öngörülmesi ile birlikte sığla yağının biyoyararlanımını arttırıcı etki göstermesi beklenmektedir. Böylece anti-ülser ve anti-kanser etkileri bulunan sığla yağının sağlık etkilerini arttıracağı öngörülmüştür. Oral tüketimi zor olan sığla yağının, toz zein nanopartiküllerine dönüştürülerek tüketici tarafından duyuşal olarak kabul edilebilir özellik kazandırılması ile doğrudan tüketilebilir olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Basit/flaş nanoçöktürme, Sığla yağı, Nanopartikül, Antiülserojenik- antikarsinojenik etki.



## ABSTRACT

### NANOENCAPSULATION OF STYRAX LIQUIDUS (*Liquidambar orientalis*) WITH DIFFERENT POLYMERS

Ülkeryıldız Balçık E., Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of  
Natural and Applied Sciences, Department of Food Engineering, Doctor of  
Philosophy Thesis, Supervisor: Hilal Şahin Nadeem, Aydın, 2024.

**Objective:** The aim of this thesis was to synthesize and characterize zein and poly-ε-caprolactone (PCL) nanoparticles encapsulated with styrax liquidus, examine their bioavailability, assess their anti-ulcerogenic effect, and evaluate their sensory consumability.

**Material and Methods:** After the preprocessing of raw styrax liquidus balsam to make it suitable for nanoencapsulation studies, the thesis work was conducted in five stages: (I) determination of suitable production conditions for styrax liquidus-loaded zein and PCL nanoparticles using simple and flash nano-precipitation methods, (II) optimization of process conditions for zein nanoparticles, (III) morphological, physical, and chemical characterizations, as well as analyses in static *in vitro* digestion environments, for zein and PCL nanoparticles produced at the optimum point, (IV) determination of the anti-ulcer effects of zein and PCL nanoparticles produced at the optimum point, and (V) sensory evaluation of the optimum zein nanoparticles.

Styrax liquidus-loaded zein and PCL nanoparticles were synthesized using simple nano-precipitation and flash nano-precipitation methods. The particle size, transmittance, polydispersity index (PDI), zeta potential values, encapsulation efficiency, and release rates in the static *in vitro* digestion environments (oral and gastric) of zein nanoparticles were analyzed and the optimum production conditions were determined. Different ratios of styrax liquidus were studied in the production of PCL nanoparticles and optimum productions were identified at appropriate styrax liquidus ratio for each methods. Physical (color, moisture, water activity, water solubility, bulk-tapped density, flowability), chemical (total phenolic content, antioxidant capacity, trans-cinnamic acid

content), *in vitro* digestion release of styrax liquidus (oral, gastric, and intestinal environments), and biological activity (anti-ulcerative effect) analyses were performed for optimum zein and PCL nanoparticles. The anti-cancer effect of raw styrax liquidus was investigated on human prostate cancer cells (PC3 and LNCaP). Styrax liquidus - loaded zein nanoparticles produced under optimum conditions were also evaluated for sensory characteristics.

**Results:** The particle sizes of styrax liquidus-loaded zein nanoparticles obtained using the simple nano-precipitation (SN) and flash nano-precipitation (FN) methods were measured as 140.31 to 427.40 nm and 151.00 to 233.95 nm, respectively, showing a narrow size distribution (PDI: 0.1-0.2%). The highest encapsulation efficiency and product yield in the production of zein nanoparticles were achieved with the FN method, with values of 95.81% and 98.90%, respectively. The release percentages of styrax liquidus in the static *in vitro* oral environment for zein nanoparticles produced by the SN method (average 7.41% and lowest 1.22%) were lower than those produced by the FN method (average 11% and lowest 2.65%). The release percentages in the static *in vitro* gastric environment for zein nanoparticles produced by the FN method (average 69% and highest 90.58%) were higher than those produced by the SN method (average 50% and highest 94.77%). It was observed that colloidal zein nanoparticles maintained their stability, and those produced by the FN method were more stable compared to those produced by the SN method. Sensory analysis indicated that the optimum powders produced by the FN method were found to be more consumable in terms of color, agglomeration, and styrax liquidus flavor intensity. The FN method was deemed more suitable for the production of stable styrax liquidus-loaded zein nanoparticles.

Styrax liquidus-loaded PCL nanoparticles were produced using the simple nano-precipitation (SN) and flash nano-precipitation (FN) methods under different production conditions, resulting in maximum styrax liquidus-loaded nanoparticle powders at rates of 2% and 3%, respectively. At high styrax liquidus ratios, both methods experienced a dramatic decrease in encapsulation efficiency and product yield. The sizes of PCL nanoparticles produced by the SN method varied between 258.67 nm and 510.00 nm, while those produced by the FN method ranged from 225.88 nm to 389.98 nm. In the static *in vitro* digestion analysis of PCL nanoparticles produced by the SN method, styrax liquidus releases ranged from a minimum of 1.59% in the oral environment to a maximum of 69.03% in the gastric environment. In contrast, the releases of nanoparticles produced by the FN method were higher, ranging from a minimum of

2.88% in the oral environment to a maximum of 75.00% in the gastric environment. The FN method was found to be more advantageous for the production of styrax liquidus-loaded PCL nanoparticles.

The *in vitro* gastric release profiles over time were investigated for optimum zein and PCL nanoparticles to select the suitable material and method for styrax liquidus nanoencapsulation. The lowest burst release of 20% in the first 15 min and a long-term sustained release profile was obtained from PCL carrier material by FN method. styrax liquidus-loaded zein and PCL nanoparticles produced by the FN method showed similar physical properties, while their chemical characteristics and *in vitro* digestion release profiles were influenced by the method and material type, resulting in variations. The anti-ulcerative effects of styrax liquidus and the obtained optimum nanoparticles were examined, and SN-PCL nanoparticles exhibited the highest urease enzyme inhibition. The anti-carcinogenic effect of raw styrax liquidus was studied on PC3 and LNCaP human prostate cancer cell lines at different doses. The IC<sub>50</sub> values were determined to be 198.79 µg/mL and 59.89 µg/mL after 48 hours of treatment, respectively.

**Conclusion:** Within the scope of the thesis study, the nanoencapsulation of styrax liquidus, possessing high bioactive properties, was successfully achieved using zein and PCL materials through the BN and FN methods. Loading styrax liquidus into zein and PCL carrier nanoparticles and obtaining stable nanoparticles were accomplished in a single step and rapidly using low-cost simple and flash nano-precipitation methods. The *in vitro* digestion analysis of the powdered nanoparticles loaded with styrax liquidus obtained at the optimal point revealed low release properties in the oral environment and high release properties in the stomach and intestinal environments. This, coupled with the anticipation that their small sizes would facilitate easy cellular uptake, is expected to enhance the bioavailability of styrax liquidus. Consequently, it is predicted that this will enhance the health effects of styrax liquidus, which has anti-ulcer and anti-cancer effects. The conversion of styrax liquidus, which is challenging for oral consumption, into powdered zein nanoparticles was concluded to make it sensorially acceptable for direct consumption.

**Keywords:** Simple/flash nanoprecipitation, Styrax liquidus, Nanoparticles, Antiulcerogenic-anticarcinogenic effect.



# 1. GİRİŞ

Beslenme bilinci artışıyla sağlıklı ve doğal gıda ürünlerine yönelik mevcut tüketici ilgisi artmıştır. Bu durum, gıda endüstrisinde sentetik gıda katkı maddeleri yerine doğal kaynaklı, biyouyumlu, kolay ulaşılabilir, ekonomik ve sürdürülebilir gıda katkı maddeleri arayışını artırmıştır. Fonksiyonel gıda araştırmaları gıdaların besin kalitesini korumak ve arttırmak için yüksek biyoaktiviteye sahip hammaddeleri çeşitli mühendislik uygulamaları ile işleyerek gıda endüstrisine kazandırabilmektedir.

Gıda endüstrisinde yüksek biyoaktif bileşik kaynaklarının kararlılıkları korunarak bir gıda bileşeni olarak üretilmesini amaçlayan mühendislik uygulamalarından biri enkapsülasyon yöntemidir. Enkapsülasyon, çeşitli özelliklerdeki biyoaktif bileşiklerin (antioksidanlar, antimikrobiyaller, vitaminler, mineraller, fitosteroller, fenolik maddeler, yağ asitleri, renk maddeleri gibi) veya nutrasötiklerin aktif bileşen (çekirdek) olarak taşıyıcı kaplama materyalleri (kabuk) yardımıyla kaplanma teknolojisidir. Bu teknolojinin amacı gıda işleme veya depolama süresince, biyoaktif bileşiklerin gıda matrisi ile fizikokimyasal etkileşimini önlemek, çevresel etmenlere karşı (ısı, ışıık, oksijen ve pH değişimi..vb) kararlılıklarını korumak, istenmeyen bozunma ürünlerinin oluşumunu önlemek, spesifik bir etkiyle belirli bir bölgede kontrollü salınımlarını sağlamak, degradasyonu minimize ederek biyoyararlanımlarını arttırmak ve gıda organoleptik-kalitatif özelliklerini geliştirmektir (Dordevic vd., 2015; Koç vd., 2010).

Herhangi bir biyoaktif bileşiğin vücuttaki çeşitli bölgelere taşınması, parçacık boyutundan doğrudan etkilenir. Boyutu nano ölçekte olan partiküllerin, yüksek yüzey/hacim oranı sayesinde gastrointestinal sistemde mukus tabakası üzerinde alıkonma sürelerinin ve hücre zarından geçişlerinin arttığı bilinmektedir (İlyasoğlu vd., 2009; Anandharamakrishnan, vd. 2014). Bu nedenle, gıda endüstrisinde yakın zamanda araştırmaları artan nanoenkapsülasyon uygulamaları, insan sağlığına faydalı görünen biyoaktif bileşiklerin hücresel yapılara kontrollü salınımlarını sağlamak, çözünürlüğünü arttırmak, erken metabolik bozulmasını önlemek, gastrointestinal emilimini kolaylaştırmak ve biyoyararlanımlarını arttırmak amaçlı araştırılmaktadır (Bazana vd., 2019). Öte yandan, nanokapsüle biyoaktif bileşikler üzerinde diyabet, kardiyovasküler, hipertansiyon, obezite, osteoporoz ve kanser gibi hastalıkları önlemek için özel

tasarlanmış hedefli salınım sistemlerine sahip fonksiyonel gıda katkı maddeleri geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (Nayak vd., 2016). Bu amaçla, gıda nanoenkapsülasyon teknolojisiyle, bitkisel yağlar, bitkisel uçucu yağlar ve doğal bitki ekstraktları nanotaşıyıcı materyallerle hapsedilerek, hedefli salınım ve yüksek biyoyararlanıma sahip yeni terapötik fonksiyonel gıdalar geliştirilmektedir (Lammari vd., 2021).

Sığla balsamı, Anadolu sığla ağacından (*Liquidambar orientalis* Mill.) elde edilen, yüksek antioksidan, antiinflamatuvar ve antiseptik özelliklere sahip, kozmetik, parfümeri, tarım, tıp ve eczacılık endüstrilerinde yaygın kullanılan sağlık etkileri yüksek doğal bir hammaddedir.

Bu tez çalışmasında, sığla balsamı saflaştırma önışlemden geçirilerek insan tüketimine ve işlemeye uygun hale getirildikten sonra elde edilen sığla yağının (styrax liquidus-SL) farklı taşıyıcı materyaller kullanılarak (organik olarak zein ve inorganik olarak poli  $\epsilon$ -kaprolakton-PCL) basit nanoçöktürme ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile nanoenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin morfolojik, fiziksel ve kimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen nanopartiküllerin biyoyararlanımı statik *in vitro* sindirim modelinde ağız, mide ve bağırsak ortamlarında sığla yağı salınım oranı üzerinden incelenmiştir. Üretilen nanopartiküllerin biyolojik aktivite özelliklerinin belirlenmesi için anti-ülseratif ve anti-karsinojenik etkileri incelenmiştir. Son olarak optimum zein nanopartiküllerinin, duyusal analizi yapılmış ve tüketiciler tarafından kabul edilebilirliği değerlendirilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Sığla Yağı (Balsamı)

Anadolu sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller) Altingiaceae familyasına ait olan Türkiye'nin güney batısında, özellikle Muğla, Denizli ve Antalya'nın deniz seviyesine yakın kısımlarında yetişen endemik bir ağaç türüdür (İstek ve Hafizoğlu, 1994). Halk arasında “günlük ağacı, amber ağacı, buhur ağacı veya suğla ağacı” olarak bilinen sığla ağacından çıkarılan sığla yağı (balsam) akademik çalışmalarda *storax*, *levant storax*, *styrax*, *styrax liquidus*, *styrax orientalis liquidus* ve *sweetgum* olarak da isimlendirilmiştir (Degirmentepe vd., 2015). Sığla ağaçları, sayısının sulama kanalları ve turizm nedeniyle giderek azalmasından ötürü Orman Genel Müdürlüğü (OGM) tarafından koruma altına alınmış, sığla yağı eldesi ve satışı OGM'ye bağlı Orman İşletmeleri'nce denetlenmektedir (Teker, 2013; Velioğlu vd., 2008). Sığla yağı eldesi yöre halkı tarafından geleneksel yöntemle, ağaç gövdesine açılan uzun ince damarlardan (yaralar) toplanan ham reçinenin yağ oranı düşük kapçıklara doldurulması ardından kaynatılması ve preslenmesi ile yapılır (İstek, 2005). Bu yöntemde, Nisan ayından Ekim ayına kadar kabuk sıyırma, damar açma (yaraların açılması), sur (yara kabuğu), sur arkası (yara kabuğu sıyırma), sefer (esas yağı alma), kara kap (sonradan çıkan fazla yağı alma), kapçıkların taşınması, kaynatma (kabuk-yağ ayrılması), presleme (buhur eldesi) ve dinlendirme aşamaları sonunda sığla yağı elde edilir ve kaplara doldurulur (Resim 2.1) (Huş, 1949; Teker, 2013; Velioğlu vd., 2008).



**Resim 2.1.** Geleneksel yöntemle Anadolu Sığla ağacından sıgla yağı üretim aşamaları.(1-kabuk sıyırma, 2-kabuklar, 3-damar açma, 4-sur (yara kabuğu), 5-kara kap (sonradan çıkan fazla yağı alma), 6-kaynatma (kabuk-yağ ayrılması), 7-presleme (buhur eldesi), 8-dinlendirme, 9-kaplara doldurma).

## 2.2. Sığla Yağının Fiziksel Özellikleri

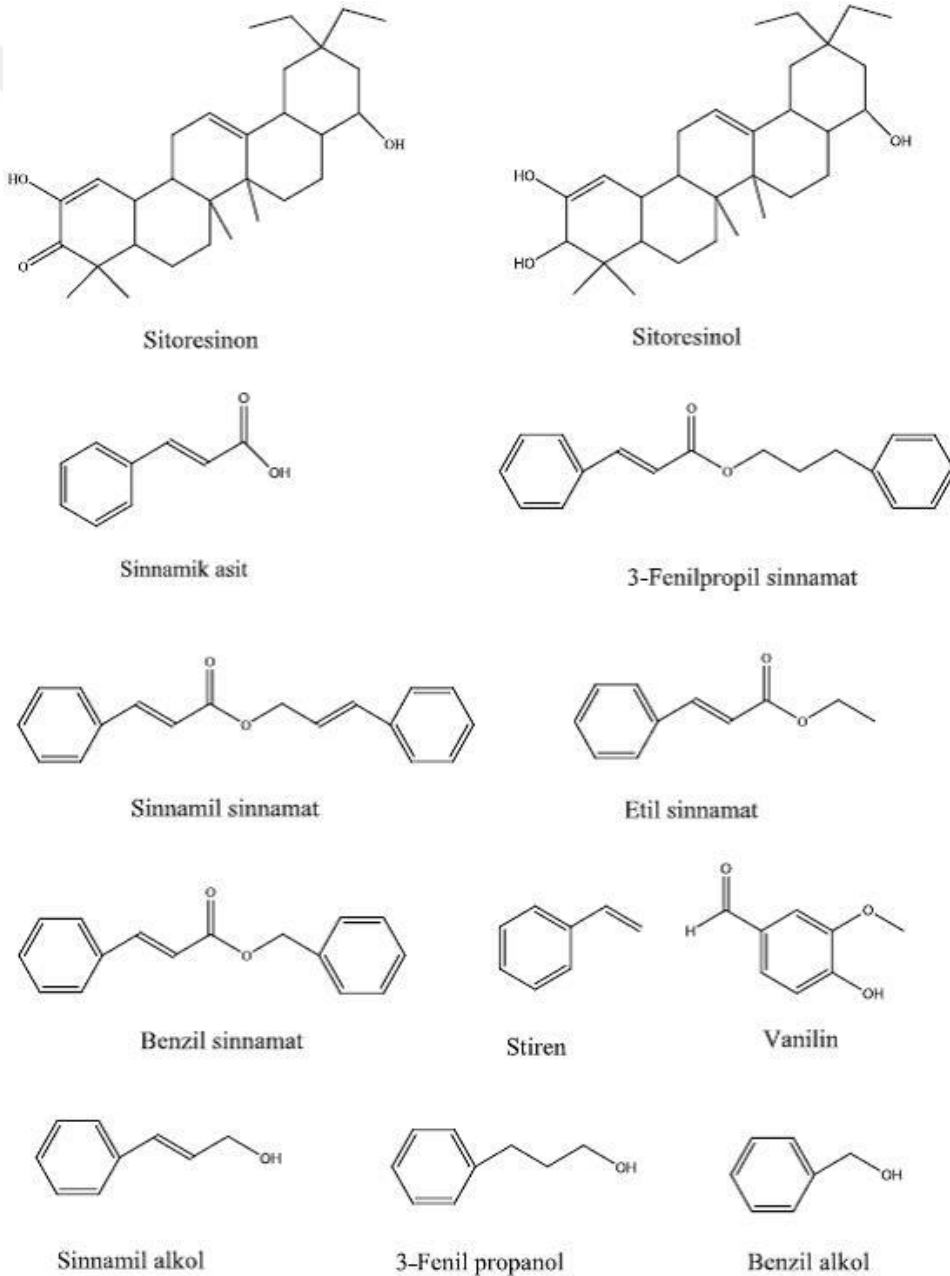
Geleneksel yöntemle elde edilmiş ham sıgla yağı oda sıcaklığında yarı akışkan, yapışkan, yarı akıcı, kıvamlı, parlak, opak ancak ince tabakalar halinde saydam görünen

ağır kütleli bir balsamdır. Görünüm olarak kirli tahin rengi olarak tanımlanan koyu kahverengimsi ancak zamanla oksidasyona bağlı olarak esmerleşen ve gri-kül rengine dönen bir renk alır (Gül, 1986; Huş, 1949; Hafizoğlu, 1996; Teker, 2013). Sığla yağının akıcılık kazandığı sıcaklık yaklaşık 33-50°C derecedir (Gül, 1986). 100°C'ye ısıtıldığında içeriğindeki suyun uçması ve yabancı maddelerin dibe çökmesi ile akıcı ve homojen hale gelir (Huş, 1949). Ham sığla yağı içinde kendi ağacından kabuk, kıymık ve yaprak ile yabancı taş, kum ve kül gibi maddeler bulunabilir (TSE, 1963; Gül, 1986). Bu nedenle geleneksel yöntemle üretilen sığla yağı, insan kullanımından önce saflaştırma gerektirmektedir. Ayrıca doğal yapısını koyuyan ve en temiz şekliyle pazara sunulan sığla yağı yabancı reçine içermemelidir (TSE, 1963; Gül, 1986). Sığla yağı suda çözünmez, ancak benzen, aseton, eter, petrol eteri, karbondisülfid ve alkol çözeltileri içinde yüksek oranda çözünür ve saydam bal rengi çözelti oluşturur (Huş, 1949; Teker, 2013; Hafizoğlu, 1982; Hafizoğlu, 1996). Sığla yağının kokusu yoğun, petrolümsü ve yüksek sinamik asit içerdiğinden dolayı tarçınımsı notada; tadı ise acı (bitter) karakterdedir (Huş, 1949; Teker, 2013; Hafizoğlu, 1996). Ham sığla yağı içeriğindeki su miktarı, arıtılmadan (distile edilmeden) %11-14 arası değişirken, arıtılmış (distile edilmiş) halinde ise %2'den az bulunur (TSE, 1963; Teker, 2013).

### 2.3. Sığla Yağının Kimyasal Özellikleri

Sığla ağacının fitokimyasal analizi incelendiğinde, flavonoid, tanen, saponin, fenol lektin, triterpen ve karotenoid yapıda bileşiklerin bulunduğu tespit edilmiştir (Okmen vd., 2014). Sığla yağı'nın gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi (GC-MS) yöntemiyle analitik araştırması yapıldığında içeriğinde bulunan baskın kimyasal moleküllerin stiren, sinamik asit, sinamil sinamat, sinamil alkol, trans sinamil alkol, etil sinemat, fenilpropil alkol, fenilpropil sinamat,  $\alpha$ -pinen, benzaldehit,  $\beta$ -pinen, benzil alkol, asetofonen ve naftalen olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.1) (Balta, 2010; Değirmen-tepe vd., 2015; Teker, 2013; Hafizoğlu, 1982; İstek ve Hafizoğlu, 1994; Tanker ve Syron, 1974). Sığla yağı içindeki major bileşenlerin ağacın yetiştiği bölgeye göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Asya kökenli sığla ağacından elde edilen sığla yağının kimyasal komponentlerinden en baskın olan bileşenler stiren (yaklaşık %70) (Fernandez vd., 2005) ve trans-sinamil alkol (yaklaşık %45) (Lee vd., 2009) olarak tespit edilmiştir. Sığla yağının büyük bir kısmını storax ile resin kelimelerinin

birleşiminden sitoresin olarak adlandırılan ve iki izomeri ( $\alpha$ -sitoresin ( $C_{30}H_{48}O_3 \cdot 1/2H_2O$ ) ve  $\beta$ -sitoresin ( $C_{30}H_{48}O_3 \cdot H_2O$ )) bulunan bir alkol-keton bileşimi reçine oluşturmaktadır (Huş, 1949; Gül, 1986; Hafizoğlu, 1996; Teker, 2013). Sığla yağı içindeki uçucu yağ oranının %0,5-1 arasında olduğu tespit edilmiş, (Hafizoğlu, 1996; Tanker ve Sayron, 1974; Teker, 2013; İstek, 1994) hem serbest hem de ester formda yalnızca sinnamik asit bulunmuştur (Hafizoğlu, 1982). Sığla balsamı içindeki majör fenolik asitler parakumarik asit ve gallik asit olarak tespit edilmiştir (Charehsaz vd., 2016).



**Şekil 2.1.** Sığla yağı majör kimyasal bileşenlerinin moleküler yapıları (Teker, 2013).

Ham sığla yağı'nın uçucu yağ kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi dışında nötral yağ ve asit fraksiyonlarının da belirlenmesi önemlidir. Yağlarda bulunan yağ asidi miktarının (trigliseritler) ne kadar hidrolize uğradığı asitlik sayısı ile belirlenir. Sığla yağının alkolle saflaştırma sonucu kimyasal metotlarla belirlenen asitlik sayısının 50-85 arasında; sabunlaşma sayısının ise 160-250 arasında olduğu belirtilmiştir (Huş, 1949; İstek, 1994; Teker, 2013; Hafizoğlu, 1986; Gül, 1986; Hafizoğlu, 1996).

Sığla ağacı yaprakları etanol ekstraktının toplam fenolik madde miktarı 333,14±7,96 mg GAE/g ekstrakt ve IC<sub>50</sub> değeri ise 3,11±0,02 mg/ml (DPPH) olarak bulunmuştur (Saraç ve Şen, 2014). Bir başka çalışmada, sığla yağı ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği 96,34 mg GAE/g olarak tespit edilmiş; antioksidan analiz sonuçlarında ise: 49,25 ± 0,54 mmol TEAC/g (CUPRAC), 39,83 ± 0,25 µmol Fe/g (FRAP), 80,34 µg/mL (DPPH) ve 51,20 µg/mL (ABTS+) antioksidan aktivite sergilediği ortaya koyulmuştur (Ulusoy vd., 2021). Bir diğer çalışmada sığla yağının buhar distilasyonu ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonlarının antioksidan aktivitesi karşılaştırılmış, serbest radikal (DPPH) süpürme oranları sırasıyla %89 ve %91 olarak bulunmuştur (Lingbeck vd., 2015). Antioksidan aktivite araştırmalarının sonuçlarının değişkenliği sığla ekstraktı, yağı veya reçine içeriğindeki toplam sekonder metabolit farklılıkları ile ilişkilendirilmektedir.

## **2.4. Sığla Yağının Biyolojik Aktivite Özellikleri**

Kompozisyonundaki kimyasal bileşiklerin gösterdiği yüksek biyolojik aktivite sayesinde sığla yağı; antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antioksidan, antihipertansif (tansiyon düşürücü), antikonvülzan (antiepileptik), antiinflamatuvar ve antiseptik özellikler göstermektedir (Sağdıç vd.,2005; Lee, 2009; Mancarz vd., 2019; Gürdal ve Kültür, 2013). Yeni çalışmalar sığla yağının kanser önkoruyucu, antikoagülant (pıhtı önleyici) ve immünsüpresif (bağışıklık sistemini baskılayıcı) bir ajan olduğunu göstermektedir (Lingbeck vd., 2015). Akademik çalışmalarda, sığla yağının düşük dozlarda fitopatolojik mantarlar, termitler, patojenik bakteriler, virüsler ve ev tozu akarları üzerinde tam inhibisyon sağladığı görülmüştür (Kartal vd., 2012; Lee vd., 2009; Mancarz vd., 2019).

Sıgla yağı gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkilidir (Oskay ve Sarı, 2007). Gıda bozulmasına yol açan ve yaygın olarak bilinen mikroorganizmalardan *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Cornebacterium xerosis*, *Enterobacteria erogenes*, *Entero-coccus faecalis*, *Klebsiellapneumoniae*, *Myco-bacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Staphylococcus aureus* gibi türlere karşı %10 oranında sıgla yağının güçlü inhibisyon sağladığı gözlenmiştir (Sağdıç vd., 2005; Gürdal ve Kültür, 2013). Bu özellikleri ile sıgla yağının deri endüstrisinde bakteriyosit olarak (Bayramoğlu, 2010), ilaç geliştirme çalışmalarında antimikrobiyal madde olarak (Lee vd., 2009), antifungal ve antitermit özelliği ile doğal ve çevre dostu ahşap koruyucu olarak (Kartal vd., 2012), ağaç çürüme direncini arttırıcı mekanik ve termal dayanım sağlayan ahşap koruyucu olarak (Değirmen-tepe vd., 2015), gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal ajan olarak (Okmen vd., 2014), medikal alanda ilaç etken maddesi ve doğal pestisit olarak (Lingbeck vd., 2015) kullanılabilirliğinin araştırmaları yapılmıştır.

## 2.5. Sıgla Yağı Standardı

İnsan tüketimine uygun olan ham sıgla yağının Türk Standartları Enstitüsü (TSE) teknik kurulu tarafından 85 nolu raporda kabul edilmiş standart özellikleri aşağıdaki maddelerde verilmiştir (TSE, 1963; Teker, 2013; İstek, 1994; Huş, 1949):

- Yeni çıkarılan yağ rengi kahverengidir (kirli tahin) zamanla oksidasyona bağlı olarak esmerleşmesi (koyu gri renk) normaldir.
- Yarı akışkan, yapışkan, kıvamlı, parlak, opak ancak ince tabakalar halinde saydam görünümlüdür.
- İçinde kendi ağacından kabuk, kıymık ve yaprak ile yabancı taş, kum ve kül bulunabilir ancak yabancı reçine bulunmamalıdır.
- Kendine has tarçınımsı kokusu ve acı (bitter) tadı olmalıdır.
- Nem oranı en çok %2 olmalıdır.
- Kuruma kaybı %5'i geçmemelidir.

- Kül miktarı en çok %1 olmalıdır.
- Özgül ağırlığı 1,091-1,113 g/cm<sup>3</sup> aralığındadır.
- Alkolde çözünmeyen madde miktarı maksimum %5 ve çözünen madde miktarı minimum %70 olmalıdır.
- Alkolle saflaştırma sonucu asitlik sayısı 50-85 arasında; sabunlaşma sayısı ise 160-200 arasında olmalıdır.
- İçeriğindeki toplan sinnamik asit miktarı %20'den az olmamalıdır.

## 2.6. Sığla Yağının Sağlık Açısından Önemi

Sığla yağının sağlık açısından araştırılması antik Mısır döneminde mumyalama, Hindistan'da cüzzam tedavisinde ve Avrupa'da parfümeri, kozmetik ve eczacılık alanlarında kullanılmasıyla başlamıştır (Teker, 2013). Yerli Amerikalılar tarafından yara ve yanık tedavisi, öksürük ve mide hastalıkları tedavilerinde kullanılmıştır (Lingbeck vd., 2015).

Sığla yağının güçlü bir antiseptik olduğu bilinmekte ve Anadolu'da çıkarıldığı bölgede yöre halkı tarafından halk ilacı (folkmedicine) olarak kullanılmaktadır. Sığla yağının üst solunum yolu enfeksiyonları (boğmaca, astım, bronşit), karın ağrısı, virütik ağız hastalıkları ve peptik/gastrik ülser tedavilerinde dahili; deride yanık, yara ve kesik tedavisinde, dudak çatlaklarını gidermede, mikrobiyal dış kaynaklı deri hastalıklarının tedavisinde, hemoroid tedavisinde harici olarak kullanıldığı bilinmektedir (Bulut vd., 2017; Altıparmak vd., 2019; Usta, 2020).

Sığla yağının gastrik koruma sağladığı ve antiülseratif etkiler gösterdiği akademik çalışmalarda bildirilmiştir (Gurbuz vd., 2013; Kültür vd., 2018; Lingbeck vd., 2015). Sıçanlar üzerinde anti-ülserojenik etkileri incelendiğinde, günlük 150 mg/kg ve 300 mg/kg oral dozda sığla yağı kullanımı sonucu sırasıyla %83,3 ( $p<0,001$ ) ve %66,7 ( $p<0,01$ ) alkol kaynaklı gastrik ülser inhibisyonu sağlandığı bildirilmiştir (Gurbuz vd., 2013). Mide ülserini tedavi etmek için kullanılan Mizoprostol sentetik ilacın pozitif kontrol olarak kullanıldığı bir araştırmada 0,4 mg/kg dozda sığla yağı kullanımı etanol kaynaklı ülserde %100 inhibisyon sağlamıştır. Sığla yağının ülsere karşı efektif koruma

sağlamasının nedeninin, içeriğinde bulunan uçucu bileşenlerinden en baskın olan stiren (%81,9) molekülüne bağlı olduğu tahmin edilmektedir (Lingbeck vd., 2015).

Artan kanser vakaları nedeniyle kanser araştırmalarının artışı sığla yağının antikanserojen etkilerinin belirleme çalışmalarını da beraberinde getirmiştir. Karaciğer, böbrek ve beyin gibi organlarda ve diğer dokularda biriken oksidan maddelere (karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) radikalleri gibi) karşı günlük belirli oranda sığla yağı kullanımının metabolizmada enzimsel antioksidan seviyelerini (GSH, GPx ve CAT gibi) arttırdığı böylece kansere karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Aydingöz, 2013; Suzek vd., 2015).

Kolesterolün endotel dokularda birikmesine neden olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı sığla yağı, içerdiği doğal triterpenler sayesinde %63-78,8/2,5 mg oranında (*in vitro*) LDL oksidasyon inhibisyonu ile kardiyovasküler sağlığı koruyucu etki göstermiştir (Andrikopoulos vd., 2003). Öte yandan sığla yağının, hepato-koruyucu etkisi, asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi ve Alzheimer hastalığının tedavisinde potansiyel kullanımının araştırılabilir olduğu düşünülmektedir (Mancarz vd., 2019).

## 2.7. Sığla Yağı Kullanım Dozu

Sığla yağı hayvan hücreleri için sitotoksik ve genotoksik olan stiren ve sinnamil alkolle sahiptir. Sığla yağının alternatif antibakteriyel ve antipatojenik ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada, insan lenfositleri üzerinde hücre canlılığı, sitotoksikite ve genotoksikite etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Hücrelere 1,6 ve 4,0 µg/mL sığla yağı konsantrasyonları ile muamele edildiğinde, 24. ve 48. saatlerde hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı ve 48. saatte LDH (laktat dehidrojenaz) düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ) (Karadeniz vd. 2011). Sığla yağı ekstraktının *in vitro* sitotoksik etkileri ve NO (nitrik oksit sentaz) inhibisyonu ile antioksidan aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada, hekzan, diklorometan, metanol ve su içinden en güçlü sitotoksik aktiviteyi diklorometan ve hekzan ekstraktları göstermiş, sadece su ekstraktının sitotoksik etki göstermediği kaydedilmiştir. Hekzan, diklorometan ve metanol ekstraktlarının NO üretim inhibisyonu üzerine IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla, 22, 22, 21 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca hekzan ekstraktlarının A549 (insan alveolar

adenokarsinomu), mPANC96 (insan pankreas adenokarsinomu), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitelyal hücreleri), MCF7 (insan göğüs adenokarsinomu) ve CaCo2 (insan kolorektal adenokarsinomu) üzerine gösterdikleri antioksidan aktivite sırasıyla IC<sub>50</sub> değeri olarak 48,9, 48,25, 46,29, 43,34 ve 39,83 µg/ml'dir (Nalbantsoy vd., 2016).

Sığıla yağının, Sprague-Dawley sıçanlarının böbreklerinde karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, CCl<sub>4</sub> enjeksiyonundan sonra NO (nitrik oksit sentaz) üretimi 7,86'dan 20,19 µmol/mg'ye yükselmiş, CCl<sub>4</sub> ve 200 mg/kg sığıla yağı birlikte enjekte edildiğinde NO seviyesi 20,19'dan 9,93 µmol/mg'a düştüğü görülmüştür (Aydınöz ve Bulut-b, 2014).

Sığıla yağının (%10'luk), beyni felçli hale getirilmiş 7 aylık ve yaklaşık 4-5 kg'lık tavşanlar üzerindeki tedavi etkisini belirlemek için günlük 0,01, 0,03, 0,07 ve 0,09 ml dozlarda vererek 9 hafta boyunca verileri kaydedilmiş; sonuç olarak felce neden olan hemorajik ve enbolik kan pıhtılarını azaltıcı yönde etki gösterdiği bildirilmiştir (Bayazit, 2009).

Sığıla yağının antiülserojenik etkilerinin *in vivo* incelendiği bir çalışmada, alkol kaynaklı ülser edilmiş Sprague-Dawley sıçanları (120-200g) üzerine günlük 150-300 mg/kg dozda sığıla yağının oral verilmesi sırasıyla %83,3 (p<0,001) ve %66,7 (p<0,001) oranında ülser inhibisyonu sağlamıştır (Gurbuz vd., 2013).

Sığıla yağının genotoksikolojik ve sitotoksikolojik araştırmasının yapıldığı başka bir çalışmada ise, etanolik ekstraktının 500-2000 mg/kg vücut ağırlığı dozuna kadar (Balb C fareleri kemik iliği üzerinde) genotoksik bir etkisi bulunmadığı, sitotoksikolojik olarak sığıla yağı ve etanolik ekstraktın IC<sub>50</sub> limiti sırasıyla 50,22±1,8 ve 59,69±11,77 µg/mL olarak bulunduğu bildirilmiştir. Stiren miktarı üzerinden hesaplandığında, 200 mg/kg doz oral kullanım güvenli bulunduğu halde bu çalışmada 1400 mg stiren oral olarak verilmiştir (Charehsaz vd., 2016).

Sığıla yağının insan kullanımı için uygun günlük doz belirleme araştırması literatürde bulunmamaktadır. Dahili kullanımda oral olarak günlük tüketim dozu yerel halk tarafından 1-2 g (1 çay kaşığı) miktar olarak belirlenmiştir (İstek ve Hafizoğlu, 1994). Kendine has keskin petrolümsü kokusu ve bitter tadı nedeniyle tek başına oral tüketimi zor olduğundan rutinde bal veya leblebi tozu ile karıştırılarak tüketilmektedir.

Sığıla yağının doğal kaynaklı oluşu ve diğer balsamlardan farklı kimyasal kompozisyona sahip olması nedeniyle halk tarafından dahili kullanımda kayda

geçirilmiş herhangi bir yan etkisi tespit edilmemiş; harici kullanımda görülen yan etkileri ise az sayıdadır. Sık görülen yan etkiler harici kullanımda gelişen alerjik reaksiyonlar ve egzema olarak kaydedilmiştir (Teker, 2013; Tanker ve Sayron, 1974).

## 2.8. Sığla Yağının Kullanım Alanları

Sığla yağının en yaygın kullanım alanları parfümeri, kozmetik, ilaç, tarım ve eczacılık endüstrileridir (Teker, 2013; İstek ve Hafizoğlu, 1994). Sığla yağı yüksek kaynama noktasına sahip bileşikleri sayesinde sabun, parfümeri, kozmetik alanlarında fiksator (buharlaştırma önleyici) olarak kullanılmaktadır. Öte yandan, spesifik tarçınımsı kokusu nedeniyle sakız ve tütün ürünleri için aroma olarak kullanılmaktadır (Gül, 1986; Teker, 2013). Farmakoloji alanında saflaştırma yapılarak (*styrax depuratus*) fraksiyonlarına ayrılan sığla yağı sinnamik asit, sinnamik alkol gibi kimyasal maddelerin doğal kaynağı olarak kullanılmaktadır (Teker, 2013; Gül, 1986). Son yıllarda eczacılık alanında yapılan çalışmalarda sığla yağının antihipertansif (tansiyon düşürücü), antihepatotoksik, antikonvulsant (epilepsi engelleyici), kanser kemoprotektif (kanseri önleyici) özellikleri araştırılmaktadır (Lingbeck vd., 2015).

Halk ilacı (folkmedicine) olarak karın ağrısı, astım, bronşit ve mide rahatsızlıkları; antiseptik özelliği ile ağız içi yaralar, dudak ve ağız çatlakları; pomat ve yakı olarak çeşitli deri hastalıkları, yanık, yaralanma, uyuz ve mantar hastalıkları tedavilerinde kullanılmaktadır (İstek ve Hafizoğlu, 1994).

Sığla yağı içeriğindeki major bileşenlerden hidroksisinnamil alkol ve trans-sinnamil alkol sayesinde güçlü nematisit, insektisit ve parazitisit olarak yaygın kullanıma sahiptir (Lingbeck vd., 2015).

Sığla yağı kabuklarından ayrıldıktan sonra buhurda kalan yağ miktarı %6-15 oranındadır ve buhur tütsü halinde kilise ve mabetlerde kullanılmaktadır (İstek ve Hafizoğlu, 1994; Gül, 1986).

## 2.9. Nanoenkapsülasyon Teknolojisi

Nanoteknoloji genel olarak malzemenin boyut ve şeklinin  $10^{-9}$  m ölçeğinde olduğu yapıların ve sistemlerin tasarımı, üretimi ve uygulaması olarak tanımlanır. Nano boyutlu malzemeler, geleneksel olarak 10-2,5  $\mu$ m boyut aralığında kaba partiküller, 2,5  $\mu$ m-100 nm boyut aralığında ince partiküller ve 100-1 nm boyut aralığında ise ultra ince (nano) partiküller olarak sınıflandırılır (Arruda vd., 2015). Nanopartiküller, biyolojik substratlarla etkileşim için mikro boyutlu malzemelere göre daha geniş bir yüzey alanına sahiptir. Bu nedenle gıda biyoaktif bileşenleri nanokapsül formunda vücuda alındığında, sindirim süreçlerinden korunur, hücre içi alımları hızlanır, biyoyararlanımları artar, gastrointestinal sistemdeki alımları iyileşir ve hedef bölgelere taşınmaları kolaylaşır (Nayak vd., 2016; Shishir vd., 2018).

Nanokapsül üretiminde yukarıdan aşağıya (fiziksel) ve aşağıdan yukarı (kimyasal) olmak üzere iki temel yaklaşım bulunur. Boyut küçültme ve partikül şekillendirme amacıyla yüksek basınçlı veya yüksek hızlı emülsifikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon gibi yüksek enerjili sistemlerin uygulamaları yukarıdan aşağıya (fiziksel) yaklaşımı oluştururken; moleküllerin kendi kendine birleşimi ve organizasyonunu sağlayan pH, sıcaklık, konsantrasyon, hidrofobik/hidrofilik kuvvetler ve iyonik güç gibi faktörlerden yararlanan nanolipozom oluşturma, koazervasyon, inklüzyon kompleks oluşturma, nanoçöktürme, iyonik jelleşme ve elektro-eğirme gibi düşük enerjili yöntemler ise aşağıdan yukarı (kimyasal) yaklaşımı oluşturmaktadır (Nayak vd., 2016; Ezhilarasi vd., 2013).

Nanoenkapsülasyon çalışmalarında, elde edilen nanopartiküller parçacık boyutu, şekil, yüzey alanı, boyut dağılımı, çözünürlük, kapsülleme etkinliği gibi fizikokimyasal özelliklerden etkilenirken, salınım mekanizmaları kapsülleme tekniğinden ve taşıyıcı materyal ile çekirdek materyalinin fiziksel-kimyasal özelliklerinden etkilenir (Nayak vd., 2016). Bu nedenle uygun nanokapsülleme tekniği belirlenirken aktif bileşik (çekirdek) ve taşıyıcı malzeme (kabuk) türü, özellikleri (moleküler ağırlık, polarite, çözünürlük, parçacık boyutu ve dağılımı, parçacık yapısal morfolojisi ve kapsülleme verimliliği) ve etkileşimleri dikkate alınır. Nanokapsülleme tekniğinin başarımı, yükleme kapasitesi, kapsülleme verimliliği ve raf ömrü yüksek, biyoyoumlu, kontrollü salınım ve yüksek biyoyararlanım özellikleri sergileyen kararlı nanopartikül geliştirilmesi ile ölçülür (Shishir vd., 2018).

### 2.9.1. Gıda Endüstrisinde Nanoenkapsülasyon

Gıda endüstrisinde enkapsülasyon çalışmaları, çeşitli özelliklerdeki doğal biyoaktif bileşiklerin (antioksidanlar, mineraller, vitaminler, renk maddeleri, fitosteroller, fenolik maddeler, yağ asitleri ve antimikrobiyaller gibi), fonksiyonel gıda bileşenlerinin veya nutrasötiklerin taşıyıcı kaplama materyalleri yardımıyla gaz, sıvı veya toz kapsül formları halinde kaplanma teknolojisidir. Enkapsülasyonun amacı, biyoaktif bileşiklerin kararlılıklarını korumak, çevresel etmenlerden (ısı, ışık, oksijen, ve diğer gıda bileşenleri gibi) koruyarak istenmeyen bozunma ürünlerinin oluşumunu önlemek, organoleptik-kalitatif özelliklerini geliştirmek, vücut içinde istenen bir bölgede kontrollü salınımlarına izin vermek, biyoemilimlerini arttırmaktır (Dordevic vd., 2015; Koç vd., 2010). Gıda endüstrisinde uygulama amacına göre mikron (0.2  $\mu$ m - 5  $\mu$ m) ve nano (20 nm - 200 nm) kapsül boyutlarında enkapsülasyon uygulamaları gerçekleştirilmektedir.

Gıda endüstrisindeki nanoteknoloji uygulamaları: kalite ve güvenlik amaçlı difüzyon kontrolü ve mikrobiyal kontaminasyon tespiti sağlayan nanobiyosensörler; antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antioksidan etkileriyle gıdalara doğal korunma sağlayan bitkisel ekstrakt bazlı nanokompozit ambalajlar ve probiyotik-biyoaktif bileşiklerin kontrollü salınımı sağlamak amacıyla geliştirilen nanokapsüller üretimi şeklinde kategorize edilebilir (Barreras-Urbina vd., 2016; Nayak vd., 2016; Shishir vd., 2018). Nanoenkapsülasyonun gıda sektörüne uygulanması, fonksiyonel bileşikleri kapsülleme, koruma ve yüksek salınım yeteneğine sahip yenilenebilir gıda sistemleri geliştirme ihtiyacından doğmuştur (Bazana vd., 2019).

Gıda biyoaktif maddelerinin vücut içindeki absorpsiyonu ve dispersiyonu partikül boyutundan doğrudan etkilenmektedir. Boyutları mikron boyutunda olan kapsüllerin, intestinal sistemde mukus bariyerini geçemediği bilinmektedir (İlyasoğlu ve El, 2010). Nanokapsülleme, biyoaktif bileşiklerin mikron boyutlu kapsüllerine kıyasla çözünürlüğünü artıran, biyoyararlanımı iyileştiren ve kontrollü salınımı hedefleyen yüksek bir yüzey alanı sunar (Fathi vd., 2012). Böylece, nanokapsüllerin bağırsak epitel dokudaki mukus tabakası üzerinde ve gastrointestinal sistemde retasyon süresi arttığından biyoyararlanımı da arttırmaktadır (Anandharamakrishnan, 2013).

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan doğal nanotaşıyıcı materyaller protein, lipit ve karbonhidrat bazlı olabilir (Nayak vd., 2016; Fathi vd., 2012). Protein bazlı nanotaşıyıcılar (peynir altı suyu proteini, kazein, jelatin, kolajen, soya, zein ve gliadin gibi) kullanılarak proteinlerin emülsiyon, hidrojel ve jelatin oluşturma özelliklerinden yararlanır ve çubuk (rod-like), kapsül veya tüp şeklinde gıda sensörük özellikleriyle uyumlu, düşük enerjili yöntemlerle yüksek besin değerine sahip nanopartiküller üretilebilir (Shishir vd., 2018; Kumar ve Lal, 2014). Lipit bazlı nanotaşıyıcılar (çoğunlukla fosfolipit ve kolesterol) kullanılarak nanolipozom, nanoşelat üretim yöntemleri ile tek/çok katlı nanoveziküller veya büyük/küçük nanoveziküller elde edilebilir (Demirtaş ve Sengel-Turk, 2022). Polisakkarit bazlı nanotaşıyıcılar (kitosan, dekstran, pektin, aljinat) kullanılarak geçirgen özellikli, yapılarındaki glikosidik bağların sindirim salgılarının tetiklemesiyle hidrolize olan ilaç salınım sistemleri geliştirilebilir (Shishir vd., 2018; Kumar ve Lal, 2014). Karbonhidrat ve protein bazlı nanokapsüller, kimyasal veya ısı işlemlerin uygulandığı yöntemlerde tam kontrole sahip değildir ve ölçek büyütme potansiyeli düşüktür. Öte yandan, lipit bazlı nanotaşıyıcılar daha fazla kapsülleme etkinliğine ve yüksek ölçek büyütme potansiyeline sahiptir, ancak hücre zarından hızlı geçerek kontrollü salınımına izin vermezler (Fathi vd., 2012). Sentetik nanotaşıyıcı materyaller sağlık ve güvenlik açısından, gıda uygulaması için "genel olarak güvenli olarak kabul edilen" (GRAS) özellikte, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir malzemeler olmalıdır (Shishir vd., 2018).

### **2.9.2. Bitkisel Yağların Nanoenkapsülasyonu**

Bitkisel yağların doğal, güvenilir ve çok yönlü fonksiyonel özellikleri sayesinde yeni terapi ve fonksiyonel ajanlar geliştirme çalışmaları gıda, tarım, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde artmıştır. Bitkisel yağlar ve aromatik bitkiler kolay erişilebilir, doğal ve tüketici ideolojisi ile uyumlu olması bakımından kimyasal veya sentetik katkı maddelerinden daha çok talep görmektedir (Lammari vd., 2021). Doğal kaynaklı medikal-aromatik bitkiler ve bitkisel yağların ikincil metabolitleri olan uçucu ve yarı uçucu yağların biyoaktif bileşenleri inflamasyon, diyabet, osteoporoz, kalp rahatsızlıkları, damar sertleşmesi ve kanser gibi hastalıkların önlenmesinde terapötik ve profilaktik koruyucu özellikler sergilemektedir (Nayak vd., 2016; Lammari vd., 2021). Bitkisel

yağların ve lipofilik biyoaktif bileşenlerin nanoenkapsülasyon çalışmaları incelendiğinde, gıda bozulmalarına neden olan mikroorganizmalara karşı antibiyotik kullanımının yerine uçucu yağların nanoenkapsüle formlarının kullanılarak doğal ve çevre dostu koruyucu yeni biositlerin geliştirildiği çalışmalar ve nutrasötiklerin kontrollü salınımlarının yapıldığı nano-taşıyıcı sistemlerin geliştirildiği araştırmalar görülmektedir. Gıda üreticileri nanopartikül salınım teknolojisiyle fonksiyonel bileşenleri kapsülleyebilmekte, gıda kalite ve güvenliğini arttırabilmekte, tat, renk, antioksidan, enzim ve antimikrobiyal madde gibi özellikleri istenen şekilde dizayn edebilmektedir (Nayak vd., 2016).

Gıda nanoenkapsülasyon teknolojisinde, polimer veya lipid kaynaklı nanotaşıyıcı yapılar kullanılarak kolloidal kararlı süspansiyon formları oluşturulur. Bitkisel yağlar, bitkisel uçucu yağlar, gıda biyoaktif bileşenleri ve çeşitli kimyasal ilaçların etken maddeleri bu karalı nanotaşıyıcı formlarla kaplanarak bir başka deyişle taşıyıcı materyallerin içlerine doldurularak yeni, hedefli katkılar-ilaçlar, kontrollü salınım ve yüksek biyoyararlanım özellikli alternatif terapötik maddeler geliştirilmektedir (Lammari vd., 2020; Lammari vd., 2021).

Lipofilik bileşiklerin nanoenkapsülasyon uygulamalarında nanoemülsifikasyon-çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme (çözücü yerdeğiştirme), iyonik jelleşme (nanojel), lipozom (nanolipozom) oluşturma ve moleküler inklüzyon kompleksi oluşturma yöntemlerinin yaygın olarak tercih edildiği görülmüştür. Bu yöntemler detaylı incelendiğinde; nanoemülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemleri yüksek enerji gerektirir, yatırım maliyetleri yüksektir. Nanolipozom oluşturma tekniğinin, nanodropletlerin endüstriyel uygulamalarda stabiliteyi koruyamamaları ve hücre membranındaki lipid yapısıyla benzerlik göstermeleri ile salınım kontrollerinin zorluğu ve fiziksel kırılabilirlikleriyle sızıntı oluşturmaları gibi nedenlerden dolayı gıda endüstrisine entegrasyonları olumsuz etkilenmektedir (Kırtıl ve Öztop, 2014). Nanojel oluşturma tekniği, uçucu yağ enkapsülasyonu için en uygun yöntem olmasına karşın partikül boyutu kontrolünün zorluğu ve koagülasyona meyilli jel yapıların oluşmasından dolayı zorluklar oluşmaktadır (Delshadi vd., 2020). Moleküler inklüzyon kompleks oluşturma yöntemi ise  $\beta$ -siklodekstrinler,  $\beta$ -laktoglobulin gibi uçucu bileşenlerle ligand oluşturabilen yüksek maliyetli moleküller gerektirdiğinden genellikle koku ve tat maskelemek veya aroma bileşenlerinin yavaş salınımlarını sağlamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Bratovic ve Suljagic, 2019). Yeni geliştirilen yöntemlerden

elektroegirme tekniği ise, daha çok sentetik nano polimer üretimi için uygun olup ve yatırım maliyeti yüksek bir yöntem olduğundan gıda endstisinde kısıtlı uygulanmaktadır (Balta, 2010).

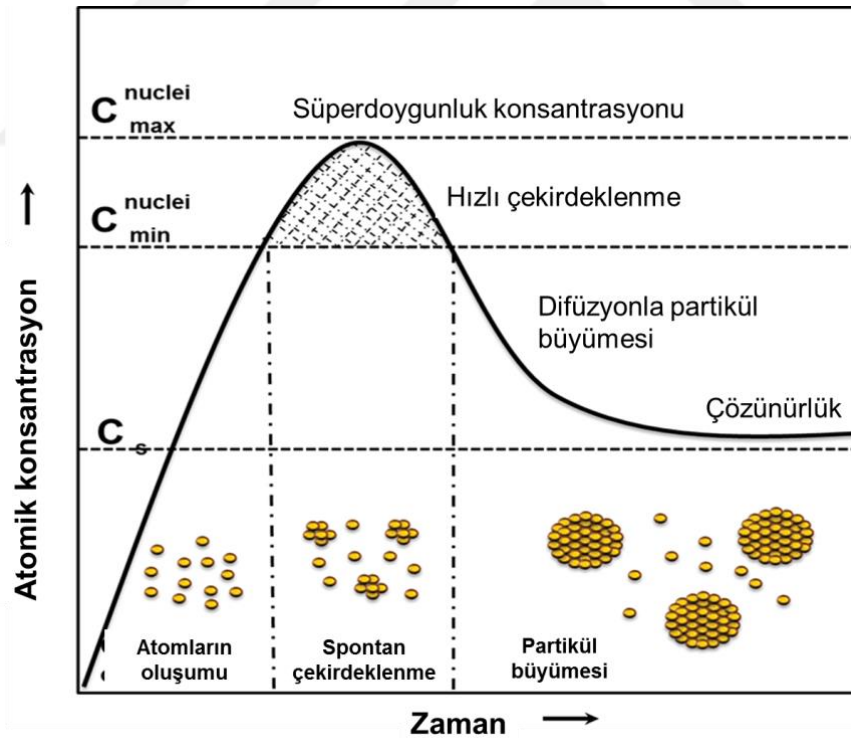
Nanoenkapsülasyon için uygun yöntem seçilirken; çekirdek ve taşıyıcı materyalin fiziksel ve kimyasal özellikleri, enkapsülasyon etkinliği, partikül kararlılığı, taşıyıcı materyal, emülsifiyer, çapraz bağlayıcı ve stabilizatör maliyeti, enerji tüketimi ve endüstriyel uygulamalara entegrasyonu öngörülmelidir. Bu bağlamda, bitkisel yağların polimerik bir kaplama materyali ile hapsedilerek enkapsülasyon verimi yüksek stabil nanopartiküllerin elde edilmesini sağlayan, biyoaktif bileşenin çözünürlük, biyoyararlanım, adsorpsiyon ve kontrollü salınımına olanak veren bir yöntem olan nanoçöktürme yöntemi gıda, kozmetik ve tıp alanlarında yaygın tercih edilen düşük maliyetli bir yöntemdir (Lammari vd., 2020).

## **2.10. Nanoçöktürme Yöntemi**

Solvent enjeksiyonu, spontan emülsifikasyon, solvent yer değiştirmesi, solvent difüzyonu ve arayüzey birikmesi olarak da adlandırılan nanoçöktürme yöntemi, submikron boyutta partikül üretiminde hızlı, düşük maliyetli ve verimi yüksek bir yöntemdir (Martinez-Munoz vd., 2020). Bu yöntemde kullanılan taşıyıcı polimerler kitosan, jelatin, nişasta, dekstran, selüloz asetat, zein gibi doğal kaynaklı olduğu gibi polilaktid-ko-glikolit (PLGA), polilaktit asit (PLA), polikaprolakton (PCL), dragit (metakrilik asit) ve poli(alkilsiyanoakrilat) (PACA). gibi biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir sentetik kaynaklı da olabilmektedir (Kumari vd., 2010).

Nanoçöktürme yönteminde nanoparcık oluşum mekanizması sperdoygunluk-çekirdeklenme- büyüme- agregasyon (supersaturation- nucleation- growth- aggregation) olarak birbirini takip eden dört aşamada gerçekleşmektedir (Lammari vd., 2020). Nanopartikül retiminde, taşıyıcı polimer ve biyoaktif bileşen uygun organik bir solvent (etanol, asetik asit, aseton gibi) içinde çözündürülür. Oluşan solvent faz, içinde yüzey aktif madde bulunan veya bulunmayan anti-solvent (su) faz içine sabit karıştırma altında kontrollü bir şekilde eklenir. Anti-solvent faz içine solvent faz ilavesi ile solventin polimeri çözme gücü azalır ve polimer çözelti içinde sperdoygunluk oluşturur. Çözücü karışımındaki polimer konsantrasyon oranı anlamına gelen sperdoygunluk aşaması,

diğer basamakların kontrol edildiği basamaktır. Organik solvent ve antisolvent fazlar birbirleriyle yer değiştirirken iki faz arayüzüne difüzyon sayesinde polimer ve biyoaktif bileşen taşınır. Arayüzeyde biriken polimer kritik konsantrasyonuna ulaştığında ilk çekirdeklenme başlar (Tao vd., 2019; Lammari vd., 2020). İlk çekirdeklenme spontan heterojen çekirdeklenmedir. Homojen çekirdeklenme için gerekli olan doygunluk noktası heterojen çekirdeklenmeden daha yüksektir (Tao vd., 2019). Spontan çekirdeklenme ile arayüzeyde hızlıca oluşan çok küçük boyutlu nanokapsüller, biyoaktif bileşeni paketledikçe ortamda bulunan serbest polimer konsantrasyonu azalmaya başlar. Süspansiyon içindeki polimer miktarı artmaya devam ettikçe kapsüller büyümeye ve kararsız yapılarından hızlıca kümelenme eğilimine girmeye başlar. Nanopartiküllerin çekirdeklenme mekanizması La Mer tarafından açıklanmıştır (Khan vd., 2019) (Şekil 2.2). Çekirdeklenme ve kapsül büyümesi ardından solvent buharlaştırılarak polimerik nanopartiküller elde edilir (Lammari vd., 2020).



**Şekil 2.2.** La Mer tarafından açıklanan nanopartikül çekirdeklenme mekanizması (Khan vd., 2019).

Kapsüllenecek biyoaktif bileşiğin hidrofobikliği, solvent-antisolvent fazların temas ve karıştırma koşulları, katı-sıvı arayüzey enerjisini azaltan ve agromerasyonu

önleyen stabilizatör varlığı ve sıcaklık, nanopartikül oluşumunda parçacık boyutu, polidispersite, zeta potansiyeli ve morfolojiyi doğrudan etkileyen parametrelerdir (Tao vd., 2019). Nanoçöktürme yöntemi, solvent- antisolvent fazlar arasında geniş arayüzey alanı sağladığından genellikle 50-300 nm boyut aralığında nano partiküller elde edilir.

Nanoçöktürme yönteminde nanokapsül oluşum mekanizmasının Fessi tarafından Gibbs-Marangoni etkisi ile gerçekleştiği savunulmuştur. Bu etki, iki faz arasındaki azalan arayüzey gerilimi ve polimer içeren küçük damlacıkların difüzyonla oluşan türbülanslarla çözücü damlacıklardan dışarı yayıldıkça, polimerin arayüzeyde çökmesi prensibi ile açıklanmıştır (Fessi vd., 1989). Kütle transferi genellikle çözünen konsantrasyonundan kaynaklanan yüzey gerilimi gradyanı ile indüklenir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon sisteminin arayüzeyindeki bu Marangoni kararsızlığı, kendiliğinden emülsifikasyona neden olur. Marangoni konveksiyonu, kütle transfer oranını artırır ve çözüneni transfer ederek Gibbs adsorpsiyonu sunar (Brian ve Ross, 1972). Bu görüşe göre nanokapsüller, çözücünün yer değiştirmesini takiben çözücü/su arayüzünde polimerin birikmesini tetikler. Antisolvent faza solvent akışı ve arayüzde hızlı polimer difüzyonu dengesiz sıvı fazlar arasında arayüzey türbülansı yaratır. Bu kararsızlık, biyoaktif bileşikler içeren küçük polimerik damlacıklar oluşturur ve iki faz arasındaki arayüzey gerilimini azaltır. Ardından, solvent uzaklaştırılarak kapsüllerden dışarı solvent uzaklaştırırken, polimer çökmesi ile nanopartiküller elde edilir (Fessi vd., 1989).

Nanoçöktürme yöntemiyle lipidlerin ve uçucu yağların polimerik bir kaplama materyali ile enkapsülasyonunun avantajları arasında tek adımda difüzyonla kendiliğinden oluşan, nano boyutta, tek boyut dağılımlı, yüksek stabilite ve doldurma kapasitesine sahip nanopartiküllerin üretilmesi, uçucu maddelerin suda çözünürlüğün sağlanması, degradasyonun önlenmesi ve kontrollü salınım gerçekleştirilmesine olanak vermesi sayılabilir (Barreras-Urbina vd., 2016; Lammari vd., 2020). Üretilen nanopartiküllerin ana problemi tersinir olmayan kümelenme ve kimyasal kararsızlıktır. Bu nedenle nanoçöktürme yöntemi ile oluşturulan nanokapsül süspansiyonlarının Ostwald olgunlaşması etkilerinden kurtarılması için kurutularak stabilitelerinin sağlanması gereklidir. Biyoaktif bileşen salınımını kontrol etme ve sürdürürebilmek için nanokapsüllerin yapısını ve şeklini değiştirmeden suyu uzaklaştıran dondurarak kurutma ve gözenek boyutunu ve kuruma süresini azaltan püskürterek kurutma teknikleri tercih edilir (Ezhilarasi vd., 2013).

Literatürde bitkisel yağların ve lipofilik bileşiklerin nanoçöktürme yöntemi ile nanoenkapsülasyon çalışmaları Çizelge 2.1’de detaylı olarak verilmiştir. Tabloya göre, nanoçöktürme yönteminin üretilen nanopartiküllerin düşük boyutları, yüksek kararlılıkları, yüksek kapsülleme verimlilikleri, *in vitro* hedefli salınım da yavaş salınımları ile lipofilik bileşikleri nanoenkapsüle etmek için etkili bir uygulama olduğu görölmektedir. Sentetik polimerik taşıyıcıları, doğal polimerik taşıyıcılara göre dış etmenlere karşı daha güçlü dayanım gösterdiğinden kararlı yapıları ve salınım profilleri daha uzun sürelidir.



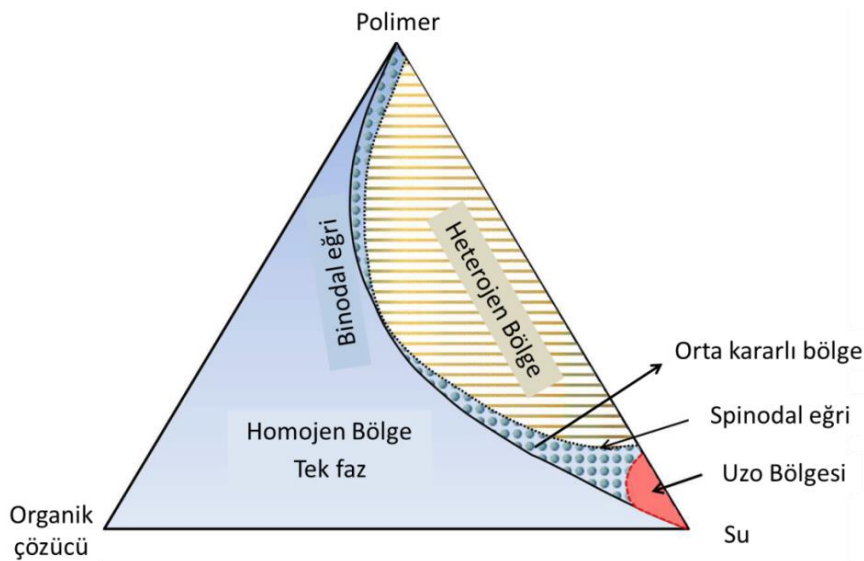
**Çizelge 2.1.** Bitkisel yağ ve lipofilik bileşenlerin nanoçöktürme yöntemi ile nanoenkapsülasyon çalışmaları

| Çekirdek materyal        | Taşıyıcı materyal | Solvent                              | Anti-solvent      | Boyut (nm) | Zeta Pot (mV) | EE (%) | Kurutma Tekniği            | <i>İn vitro</i> salınımı | Uygulama alanı | Ref.                        |
|--------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|------------|---------------|--------|----------------------------|--------------------------|----------------|-----------------------------|
| Kekik yağı               | Kitosan           | %2 Asetik-asit-su                    | Metanol           | 117-226    | +27           | -      | Evaporasyon                | 390 dk-%100              | Gıda           | Sotelo-Boyás-a vd., 2017    |
| Biber Ağacı yağı         | Kitosan           | %2 Asetik-asit-su                    | Metanol           | 335,3      | +38,5         | -      | Evaporasyon                | -                        | Tarım          | Chávez-Magdaleno, vd., 2018 |
| Misket limonu yağı       | Kitosan           | %2 Asetik-asit-su                    | Metanol           | -          | +10           | -      | Evaporasyon                |                          | Gıda           | Sotelo-Boyás-a vd., 2017    |
| Biberiye yağı            | PCL               | Aseton+Span20                        | Su+ Tween 20      | 220        | -19,9         | 99     | -                          | 8 hafta stabil           | Tıp            | Ephrem vd., 2014            |
| Çörekotu yağı            | PCL               | Aseton                               | Su+ PVA+ Tween 80 | 230-260    | -20/-30       | 84     | -                          | 1 ay stabil              | Tıp            | Badri vd.,2018              |
| α-Tokoferol              | PCL               | Aseton:Aseton/metanol 60/40+ lesitin | Su+ Pluronik F68  | 180-203    | -30,6/-51     | 75-90  | Evaporasyon+Filtrasyon-    | -                        | Ecza           | Noronha vd., 2013           |
| Kurkuminoid              | PCL               | Aseton                               | Su+ Pluronik F68  | 160-180    | -10/-15       | -      | Filtrasyon +Liyofilizasyon | 3 ay stabil              | Tıp            | Rocha vd.,2020              |
| Lavanta yağı             | PLA               | Aseton +Epikuron 170                 | Su+ Poloksamer    | 26-78      | -             | 73-75  | -                          | 500 dk %40               | Ecza           | Popielski vd., 2016         |
| Quersetin                | PLA               | DCM                                  | Su+ PVA           | 32-152     | -             | 62     | Ultrasantrifüj+Evaporasyon | -                        | Tıp            | Pandey vd.,2015             |
| Zeytin yaprağı ekstraktı | PLA               | Aseton                               | Su+ PVA           | 246        | -27,5         | 49     | Evaporasyon+ Santrifüj     | 2 saat %49               | Kozmetik       | Kesente vd., 2017           |
| Rutin                    | PLGA              | Aseton                               | Su+ PVA           | 174-211    | -21/20        | -      | -                          | 8 gün %25                | Kimya          | Kirik ve Kızılbey,2019      |
| Kapsaisin                | PLGA              | DMSO                                 | Su                | 150-162    | -             | 49     | Filtrasyon+Evaporasyon     | 2 hafta %100             | Ecza           | Kim vd.,2011                |

**Çizelge 2.1.** Bitkisel yağ ve lipofilik bileşenlerin nanoçöktürme yöntemi ile nanoenkapsülasyon çalışmaları (Devamı)

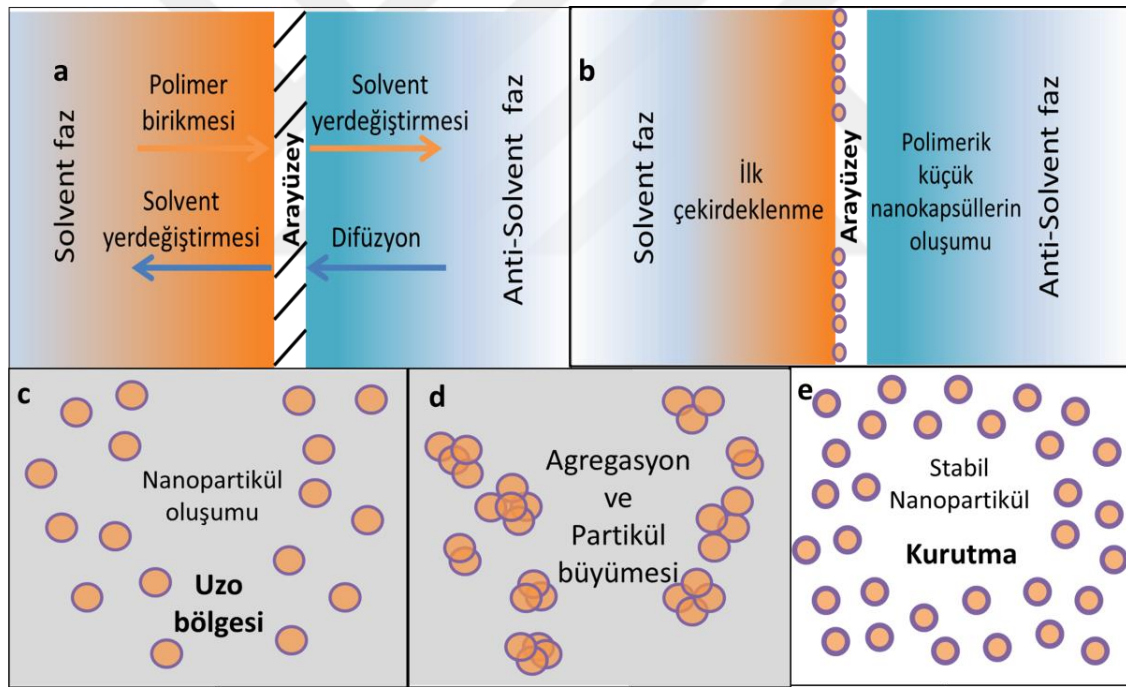
| Çekirdek materyal              | Taşıyıcı materyal | Solvent                    | Anti-solvent                           | Boyut (nm) | Zeta Pot (mV) | EE (%) | Kurutma Tekniği                          | <i>İn vitro</i> salınımı | Uygulama alanı | Ref.                         |
|--------------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------------------------|------------|---------------|--------|------------------------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|
| Karvon                         | PLGA              | DMS                        | Su                                     | 126        | -             | 61     | -                                        | -                        | Gıda           | Esfandyari-Manesh, vd., 2013 |
| Vitamin D3                     | PLGA              | Aseton                     | Su+ Montanox VG 80                     | 170-250    | -             | 70-97  | Evaporasyon                              | 168 saat %40             | Tıp            | Almouazen vd., 2013          |
| Limon otu, nane ve tarçın yağı | Selüloz asetat    | Aseton                     | Su                                     | 140-180    | -36           | 14-82  | Filtrasyon+ N <sub>2</sub> buharlaştırma | -                        | Tıp            | Liakos, vd., 2018            |
| Hidrofobik biyosit             | Selüloz asetat    | Aseton                     | Su                                     | 300-650    | -             | -      | Santrifüj +Liyofilizasyon                | -                        | Tıp            | Cordt vd., 2020              |
| Penicillin G                   | Selüloz asetat    | Su                         | Aseton                                 | 97         | -             | -      | Santrifüj +Kurutma+ Etanolde yıkama      | 70 saat %60              | Ecza           | Ho vd., 2022                 |
| Bergamot yağı                  | Eudragit          | Aseton                     | Su                                     | 57-208     | +39/+74       | 28-84  | -                                        | -                        | Gıda           | Froio vd., 2019              |
| Resveratrol                    | Zein              | %80 Etanol-su              | Tamponlu etanol (pH:7,3)               | 50-108     | +20/-20       | 30-57  | Santrifüj+ Filtrasyon                    | 5 saat %20               | Kimya          | Xing vd.,2022                |
| Kumarin                        | Zein              | %92,8 Etanol/su            | Lesitin ve pluronik içeren tamponlu su | 365        | -11,3         | 62     | Kryoprotektanlı liyofilizasyon           | 9 gün %30                | Ecza           | Podaralla ve Perulmal., 2010 |
| Ellajik asit                   | Zein              | %70 Etanol/su              | Su                                     | 281-370    | +32/+37       | 82-95  | -                                        | 24 saat %24              | Gıda           | Tavares vd., 2021            |
| Bal                            | Zein + Kitosan    | %80 Etanol/su(asetik asit) | Su                                     | 125-185    | -12/+48       | 50-70  | Homojenizasyon+ kurutma                  | 180 gün stabil           | Gıda           | Loureiro vd.,2022            |

Nanoçöktürme yönteminde, organik faz ve sulu faz arayüzeyinde hızlı difüzyona bağlı oluşan türbülans ve termal eşitsizlikler arayüzey gerilimini en aza indirerek polimer için bir çözünmezlik durumu oluşturur ve nano boyutta partikül çökmesine neden olur (Gibbs-Marangoni etkisi) (Fessi vd., 1989). Bu durum polimer/solvent/anti-solvent faz sisteminin kimyasal kararsızlığına dayanan bir mekanizma ile açıklanır. Bu mekanizma uzo (ouzo) etkisi olarak ifade edilir (Lepeltier vd., 2014). Bu sistemde solvent faz anti-solvent faza doğru hareket eden parçacıkları oluşturan moleküllerin aşırı doygunluk noktasına hızla erişmelerini sağlar, böylece klasik çekirdeklenme ve büyüme sürecini takip eden nanopartikül oluşumuna spontan ve hızlı bir şekilde izin verir. Sonuç olarak kendiliğinden en küçük boyutta oluşan homojen ve tek dağılım sergileyen stabil nanopartiküller, hazırlanan polimer/solvent/anti-solvent faz formülasyonlarına bağlı olarak uzo etkisinin hakim olduğu sistem koşullarında elde edilir (Martinez-Munoz vd., 2020). Nanoçöktürme yönteminde uzo alanı, düşük polimer konsantrasyonlarına ve düşük çözücü/su oranlarına karşılık gelen binodal ve spinodal eğriler arasındaki dar bir alandır ve bu alanın dışındaki koşullarda hazırlanan çözünen/çözücü/su sistemlerinde mikron boyutlara ulaşan büyük agregalar üretilir. Bir diğer ifadeyle nanoçöktürme yönteminde polimer/solvent/anti-solvent fazların oranları polimerin düşük konsantrasyonda olduğu ve solvent fazın anti-solvent faza oranına göre daha düşük olduğu durum nano ve mikron altı parçacıkların oluşumuna fırsat veren sınır koşuldur (Lepeltier vd., 2014) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Üçlü hidroforik çözünen(polimer)/çözücü/su sisteminin faz diyagramı ve sıvı-sıvı çekirdeklenme sürecinin veya uzo bölgesinin şematik açıklaması (Botet, 2012).

Nanoçöktürme tekniği ile nanopartikül oluşum mekanizması, Şekil 2.4'deki şematik gösterimde ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Şekil 2.4'de, görünüm a, süper doygunluğu ve arayüzey polimer birikimini, ardından solvent/su arayüzünde solvent yer değiştirmesini göstermektedir. Arayüz türbülansının neden olduğu Marangoni kararsızlığı, kritik polimer konsantrasyonunda, görünüm b'de görüldüğü gibi ilk çekirdeklenme oluşur. Görünüm c'de, arayüzeyde çekirdeklenmiş biyoaktif bileşik içeren koloidal küresel nanokapsüller görülmektedir. Süspansiyondaki koloidal nanopartiküller, görünüm d'de görüldüğü gibi polimer miktarı artmaya devam ettikçe birleşmeye başlar ve partikül büyümesi gerçekleşir. Uzo bölgesinde oluşan partiküllere agregasyondan önce kurutma uygulanırsa, nano boyutlu tek dağılımlı partiküller görünüm e'deki gibi elde edilebilir.



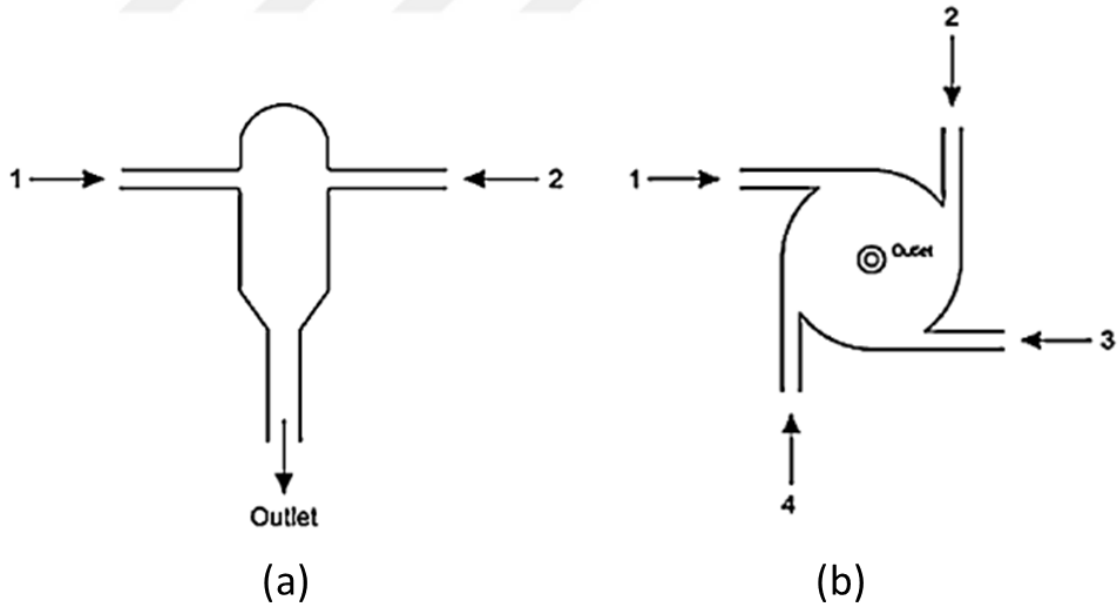
**Şekil 2.4.** Nanoçöktürme yöntemi ile nanoparçacıkların oluşum mekanizmasının şematik gösterimi.

## 2.11. Flaş Nanoçöktürme Yöntemi

Flaş nanoçöktürme (Flash nanoprecipitation-FN) yöntemi, yüksek doldurma kapasitesine sahip parçacıkların daha küçük boyutlarda kontrollü bir şekilde üretim

yöntemidir. Aktif bileşik ve polimer içeren organik solvent faz ve anti-solvent fazın birbirlerinden ayrı bir karıştırma çemberi alanında jet akışla karıştırıldığı ve aynı zamanda solvent fazın anti-solvent faz içine sabit karıştırma altında eklendiği sistemdir. Karışma çemberinde jet akışla karşılaşan fazlar girdap oluşturarak yüksek arayüzey alanı sağlar ve bu arayüzeyde oluşan anlık difüzyon sayesinde hızlı nanoçöktürme işlemi gerçekleşir (Barreras-Urbina vd., 2016).

Flaş nanoçöktürme uygulamalarında, suda çözünürlüğü düşük ilaçların veya lipofilik bileşiklerin mikroakışkan karıştırıcı sistemler yardımıyla ilaç yüklü nanopartiküller, saf ilaç nanokristaller, polimerik miseller, polimerik nanopartiküller, katı-sıvı nanopartiküller ve polielektrolit kompleks yapılar oluşturulmaktadır. Nanopartikül oluşum mekanizmasında, süperdoyguluk basamağı sınırlı çarpan jet karıştırıcı (Confined impinging jets mixer-CIJM) ve çok girişli girdap karıştırıcı (Multi-inlet vortex mixture-MIVM) gibi mikroakışkan karıştırma düzenekleri yardımıyla kontrol edilerek çok küçük nanopartiküller elde edilebilmektedir (Şekil 2.5) (Tao vd., 2019).



**Şekil 2.5.** Türbülanslı koşulları oluşturan çeşitli karıştırıcı modelleri (a) Sınırlı çarpan jet karıştırıcı- Confined impinging jets mixer-CIJM (iki girişli), (b) Çok girişli vorteks karıştırıcı- Multi-inlet vortex mixture-MIVM (dört girişli) (Saad vd., 2016).

Flaş nanoçöktürme yönteminde, karıştırma çemberinde solvent ile anti-solvent fazlar iki sıvı bölmesinin giderek daha ince lameller oluşturmak üzere birbirini çevreleyen çok katmanlı yapılar oluşturarak difüzyon yoluyla moleküler değişime izin veren kontrollü çekirdeklenme, süperdoğgunluk durumuna çok hızlı bir geçiş sağlayarak polimer çekirdeklenmesi ile sonuçlanır (Saad ve Prudhomme, 2016). Böylece polimer aktif bileşen etrafında hızla hidrofobik bir kapsül oluşturarak partikül büyümesini ve kümeleşmeyi önleyen ve dar, kontrollü boyut dağılımıyla sonuçlanan sterik stabilizasyon sağlar (Saad ve Prudhomme, 2016; Tao vd., 2019). Flaş nanoçöktürme yöntemi, basit nanoçöktürme yöntemine kıyasla, saniyeler içinde anlık ve çok küçük boyutlu nanoparçacık oluşumunu sağlar (Barreras-Urbina vd, 2016).

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile sınırlı çarpan jet karıştırıcı (CIJ) kullanılarak zein kolloidal nanopartiküllerinin üretildiği bir çalışmada Na-kazeinat stabilizatör olarak kullanılmış ve 127-327 nm stabilizatörsüz; 130-140 nm stabilizatörlü olarak elde edilmiş parçacıkların zeta potansiyelleri hidrofobik etkileşim limitine yakın +23.6 mV olarak bulunmuştur (Li vd., 2014). Bir diğer çalışmada, resveratrol yüklü zein nanopartikülleri flaş nanoçöktürme yöntemi ile çok girişli girdap karıştırıcı (MIVM) kullanılarak milisaniyeler içinde 50-108 nm boyutunda, dar bir boyut dağılımında (PDI:0,1) elde edilmiştir (Xing vd., 2022). Kitosanın stabilize ettiği bal yüklü zein nanoparçacıkları, flaş nanoçöktürme yöntemi ile sınırlı jet karıştırıcı (CIJ) kullanılarak 200 nm altında üretilmiş ve parçacıkların 30 gün boyunca stabil kaldığı bildirilmiştir (Loureiro vd., 2022). Antikanser ilaç olarak yaygın olarak kullanılan paklitaksel (PTX), ilaç stabilitesini artırmak için PEG-PLA ve zein kombinasyonu ile flaş nanoçöktürme yöntemiyle kapsüllenmiştir. %78 kapsülleme etkinliği ve 200 nm'den daha küçük boyutta üretilen nanoparçacıklar, *in vitro* sürekli ilaç salınımı göstermiştir (Ye vd., 2022). Başka bir çalışmada,  $\beta$ -karoten yüklü PEG-PCL nanoparçacıkları çok girişli bir vorteks karıştırıcı (MIVM) kullanılarak yaklaşık 200 nm partikül boyutunda, yüksek yükleme verimine (>%86) ve yüksek stabiliteye sahip olarak çok hızlı bir şekilde sentezlenmiştir (Fu vd., 2018).

## **2.12. Koloidal Nanopartikül Stabilizasyonu**

Nanokapsülasyon metotları ile üretilen koloidal nanokapsüller içeren süspansiyonlar elde edilmektedir. Koloidal homojen süspansiyondaki nanokapsüllerin stabilizasyonundaki temel sorun tersinir olmayan fiziksel (aglomerasyon, parçacık birleşmesi) ve kimyasal (polimer hidrolizi, kapsül sızıntısı, depo süresince kimyasal reaksiyonlar ve mikrobiyal kontaminasyon) kararsızlıktır (Abdelwahed vd., 2006; Ali ve Lamprecht, 2017; Guterres vd., 2009).

### **2.12.1. Fiziksel Stabilizasyon**

Süspansiyon içinde homojen koloidal nano parçacıkların termal hareketi Brownian hareket olarak adlandırılır. Partiküller, diğer partiküllere ve bulundukları kabın duvar çeperine rastgele çarparak sürekli yön değiştirirler. Brownian hareketi parçacıkların yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyon bölgesine doğru konsantrasyonlar eşitleninceye kadar devam eder. Partiküllerin bu difüzyon ve konveksiyonel (Brownian) hareketi boyutları ile doğrudan ilişkilidir. Nano boyutta bu hareketler yerçekimi kuvvetine karşı çıktığından partiküller askıda kalma eğilimindedirler (Abdelwahed vd., 2006).

Nanopartikül üretimi çalışmalarında, fiziksel stabilite ile ilgili dikkat edilmesi gereken hususlar arasında partikül boyutu, polidispersite indeksi, kapsülleme etkinliği ve aktif maddenin uzun bir süre boyunca salınması yer almaktadır (Pascoli vd., 2018). Partikül çevresinde elektriksel çift katmandaki yük (zeta potansiyeli) nanopartikülün agrave olma eğilimi hakkında bilgi verir. Stabilizatör kullanılarak, sterik stabilizasyon sağlanabilir ve aglomerasyon önlenir (Abdelwahed vd., 2006; Melo vd., 2019).

### **2.12.2. Kimyasal Stabilizasyon**

Nano boyutta kapsüllenmiş aktif bileşikler için kimyasal stabiliteyi iyileştirmek ve bu sistemlerin raf ömrünü uzatmak için stratejiler geliştirmek çok önemlidir (Pascoli

vd., 2018). Koloidal polimerik partiküllerin kimyasal stabilizasyonları, koloidal dispersiyonların sıcaklık, pH ve iyonik güç ile formülasyondaki polimer kompozisyonu, cinsi, molekül ağırlığı gibi özelliklerden doğrudan etkilenir (Abdelwahed vd., 2006).

Hidrolitik bozunabilen polimerler depolama esnasında ne kadar kontrol altında tutulsalar da zamanla bozunacaklardır. Biyolojik polimerler, zamanla protein moleküllerinin termal denatürasyonu ve agregasyonu gibi durumların oluşabilmesine bağlı olarak düşük dayanım gösterirler. Yüksek molekül ağırlığına sahip sentetik polyester polimerler daha yüksek dayanım gösterirler. Kapsül salınımlarında kimyasal stabilite üzerine, sıcaklık, pH, yük yoğunluğu, iyonik güç ve polimer konsantrasyonu ve oranı gibi parametrelerin etkisi oldukça fazladır (Zhang vd., 2019). Depolama esnasında nanopartiküllerin sıcaklık koşulları belirlenirken 37°C ve üzerinin hızlı degradasyona, oda sıcaklığının (25°C) ise agregasyona neden olduğu görüşmüştür, ideal sıcaklık ise +4°C olarak belirlenmiştir. Polyester polimerler için fizyolojik koşullara karşılık gelen tamponlu bir çözelti pH'ı ve +4°C'de yüksek stabilite gözlenmiştir (Abdelwahed vd., 2006).

### **2.13. Nanopartikül Kurutma Yöntemleri**

Koloidal dağılmış nanopartiküllerin uygun kurutma yöntemleriyle, Ostwald olgunlaşmasını önlemek ve nanopartikül kararlılığının sağlamak gerekmektedir. Bu amaçla, nanokapsüllerin yapısını ve şeklini değiştirmeden suyu uzaklaştıran dondurarak kurutma ve gözenek büyüklüğünü ve kuruma süresini azaltan püskürtmeli kurutma teknikleri yaygın olarak tercih edilmektedir (Ezhilarasi vd., 2013).

Liyofilizasyon olarak da ifade edilen dondurarak kurutma, donmuş materyallerden vakum altında süblimasyon yoluyla suyun uzaklaştırılmasına dayanan bir kurutma tekniğidir. Bu işlem yavaş ve pahalı olmasına rağmen, koloidal polimerik nanokapsüllerin fiziksel ve kimyasal kararlılığını sağlamak için yaygın kullanılır. Dondurarak kurutma işlemi, dondurma, ön kurutma (süblimasyon) ve kurutma olmak üzere üç kısma ayrılır. Donma aşamasında, suyun buza dönüşmesi nedeniyle sıvı süspansiyonun konsantrasyonu ve viskozitesi artar ve amorf-kristal bir yapı oluşur. Ön kurutma aşamasında numune yüzeyindeki buzun süblimleşmesi ile su buharı numune yüzeyine aktarılır ve kondenser yardımıyla yoğunlaştırılır. Son olarak kurutma

aşamasında ise yüksek vakum (4-40 Pa) ve düşük sıcaklık (-40°C'nin altı) koşullarında suyu tamamen uzaklaştıracak şekilde kurutma işlemi gerçekleştirilir. Süblimasyon bittiğinde malzeme yüzeyinde gözenekli yapı kalır. Genellikle glikoz, sükroz, trehaloz, dekstran, sorbitol..vb gibi kriyoprotektanlar nanomateryalleri donma ve kuruma streslerinden korumak için kullanılır (Abdelwahed vd., 2006; Ali ve Lamprecht, 2017). Hızlı soğutma, küçük buz kristallerinin oluşumuna yol açar ve nanokapsüller üzerindeki mekanik stresi azaltabilir. Donma ve dehidrasyon stresi ile oluşan agregasyon, hızlı dondurma uygulanarak herhangi bir kriyoprotektan olmadan önlenabilir.

Püskürtmeli kurutma, hızlı, tek adımlı, ekonomik, ölçeklenebilir ve verimli bir yöntem olması nedeniyle nanokapsüllerin stabilizasyonu için tercih edilen tekniktir. Bu yöntemde koloidal nanokapsüller, sıcak bir kurutma odasına püskürtülerek homojen küresel ince parçacıklar halinde kurutulur (Ezhilarasi vd., 2013). Bu yöntem, hem ısıya duyarlı hem de ısıya dayanıklı malzemeler olan biyolojik kompleksler ve yüksek değerli terapötik farmasötik nanokapsülleme için uygundur. Bir püskürtmeli kurutucunun dört temel bölümü vardır: (1) atomizasyon, (2) sprej-sıcak hava teması, (3) kurutma ve (4) ayırma. Nanokapsül süspansiyonu, çözücü buharlaşması için sıcak hava ile temas ettirilerek ince nanoparçacıklardan oluşan bir sprej halinde atomize edilir (Lee vd, 2011). Atomizasyon, boyut, şekil, geometri ve kuruma süresi gibi nihai parçacık morfolojisini doğrudan etkilemenin kritik bir parçasıdır. Nanokapsül süspansiyonlarının yüzey gerilimi ve viskozite gibi özellikleri de atomizasyon sürecini etkiler. Nanokapsülleri kurutmak için kullanılan atomizer/nozül türleri; döner atomizer, tek akışkanlı (hidrolik veya basınçlı) nozül, pnömatik (çoklu akışkan) nozül ve ultrasonik nozüldür (Ziaee vd, 2019).

Püskürterek kurutulmuş nanoparçacıkların, uzun sürede koloidal homojen nanokapsül süspansiyonlarından daha yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterdiği belirtilmiştir (Guterres vd., 2009). Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için parçacıkların sıcaklığı, nem içeriği, boyutu, polidispersitesi ve morfolojisi ve verimi yararlı yanıtlardır (Guterres vd., 2009).

## 2.14. Nanopartikül Karakterizasyonu

Nanoparçacıkların karakterizasyonu morfoloji ve kimyasal kompozisyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Boyut ve boyut dağılımı, agregasyon/birleşme, yüzey elektriksel çift katman yükü (zeta potansiyeli) ve spesifik yüzey alanı, gözeneklilik ve sorpsiyon özellikleri gibi analizler morfolojik karakterizasyonla ilgiliyken, parçacık yapısı, yüzey kimyası, kristallik ve elemental-kimyasal kompozisyon gibi analizler kimyasal karakterizasyonla ilişkilidir (Mourdikoudis vd, 2018). Nanopartiküllerin karakterizasyonu, parçacıkların olası uygulamalarını, faydalarını ve toksisitelerini belirlemek için oldukça önemlidir (Ezhilarasi vd, 2013).

Parçacıkların boyutunun, şeklinin ve kümelenmesinin genel değerlendirmesinde, üç boyutlu görüntü ve quantitatif bilgi almak için mikroskopik teknikler kullanılır. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Geçirgen Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yaygın olarak tercih edilen mikroskopik tekniklerdir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), vakum altında bir elektron ışını kullanarak kuru nanopartiküllerin yüzeyinin ve kalınlığının 3-D görüntülemesini sağlar (Modena vd., 2019). Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analiz prensibi SEM'den farklıdır. TEM'de elektron ışını, elektron geçirgenliği için ultra ince bir numuneye odaklanır. Yüzey özellikleri, elektronla iletilen ince bir numune ile elde edilir (Pal vd., 2011). Atomik Kuvvet Mikroskobunda (AFM), numunenin yüzeyini görselleştirmek için konsollu uç adı verilen bir tarama probu kullanılır. Yüzey atomlarının uç ile numune arasındaki etkileşimleri, fotodiyot dizisine yansıtılan bir lazer ışını yardımıyla kaydedilir (Modena vd, 2019). AFM, nanopartiküllerin atomik topografyalarının analizine izin veren yüksek çözünürlüklü bir tekniktir (Arruda vd., 2015).

Dinamik Işık Saçılımı (DLS), hidrodinamik parçacık çapını ve zeta potansiyeli ölçme yoluyla büyüme kinetiğini belirleme alanında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) tekniği, koloidal süspansiyonlardaki parçacıkların Brownian hareketine göre boyutunu ve ortalama hidrodinamik çapını değerlendirmek için kullanılır. Monokromatik ışık (lazer) küresel parçacıklara çarptığında, ışığın dalga boyunda nanoparçacıkların boyut ve boyut dağılımı hakkında bilgi veren bir değişikliğe yol açar. Nanoparçacıkların yüzey yükü, biyoaktif bileşiklerle

elektrostatik etkileşimleri ve kolloidal stabilitesi, nanoparçacık etrafında elektriksel bir çift katman anlamına gelen zeta potansiyeli ile ölçülmektedir (Pal vd., 2011).

Spesifik yüzey alanı bilgisi, Brunauer Emmett Teller (BET) analizi ile belirlenir Brunauer Emmett Teller (BET) analizinde numunenin yüzeyi, kısmi vakum altında belirli bir miktarda N<sub>2</sub>'nin adsorpsiyonu ve salımıyla ölçülür (Hwang ve Barron, 2011). Nanopartiküllerin kaplama tanımlanması genellikle Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) ile değerlendirilir. Öte yandan nanopartiküllerin yüzey organik bileşik kompozisyonu ve ligand bağlanma bilgisi yine FTIR ile belirlenir (Arruda vd., 2015).

Nanopartikül karakterizasyonunda birtakım zorluklar bulunmaktadır. Karakterizasyon tekniklerinin çoğu, toz haline getirilmiş nanoparçacıklar kullanılarak gerçekleştirilir ve nanokapsül süspansiyonlarının kurutma işlemi kapsül yapısının bozulmasına veya topaklanmaya neden olabilir. Öte yandan, SEM analizi gibi bazı analizler için partikül yüzeyi vakum altında altın veya grafit ile kaplanır. Bu süreç, partikül aglomerasyonuna yol açabilir (Arruda vd., 2015).

## **2.15. Nanopartikül Güvenliği ve Toksisitesi**

Gıda nanoteknolojisindeki araştırmalar, üretilen nanomalzemelerin insan tüketimi için güvenliği konusunda tüketicilerin endişelerini de ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle ticari olarak kullanıma sunulmadan önce toksisite ve potansiyel sağlık risklerinin kapsamlı bir değerlendirmesi gereklidir (Bazana vd., 2019). Nano boyutlu malzemelerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri hakkındaki bilgi eksikliğine bağlı birtakım güvenlik, çevre, etik ve düzenleme konuları tartışılmıştır (EFSA, 2009).

Gıda nanopartikülleri, insan vücudu ve çevre ile doğrudan temas halinde kullanılmaktadır. Bu nedenle oral tüketim sonrası nanopartiküllerin biyotransformasyonu vücut içinde artan dağılımı, çözünürlüğü ve bağırsak zarlarından transfer edilebilme yeteneğinin gelişmesi ile hızlı biyoemilimi sitotoksisite ve genotoksisite araştırmalarını da beraberinde getirmiştir (Cushen vd., 2012; Ezhilarashi vd., 2013).

Gıda uygulamalarında kullanılmak üzere doğal malzemelerle ve GRAS "Genel Olarak Güvenilir Olarak Kabul Edilen" lipid bazlı, protein bazlı ve polisakkarit bazlı doğal biyopolimerler ile poli(laktik/glikolik), poli (ε- kaprolakton(PCL), polilaktid(PLA) ve poli(laktid-ko-glikolit)(PLGA) gibi sentetik alifatik polyester polimerler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, biyouyumlulukları ve toksik olmamaları açısından onaylanmıştır (Kumar ve Lal, 2014). PLC, PLA ve PLGA polimerleri enzimatik olarak katalizlenen hidrolize uğrar ve *in vivo* bozunma süreleri, polimerlerin molar kütlesi ve kristallik derecesi ile ilişkilidir (Rocha vd., 2020; Hirsjarvi, 2008).

Küçük boyutları göz önüne alındığında, nanopartiküller dolaşım ve lenfatik sistemlere girebilir ve yer değiştirebilir, sonuçta vücut dokularına ve organlarına ulaşabilir. Ayrıca küçük partikül boyutu ve yüksek spesifik yüzey alanı, reaktiviteyi artırır ve biyolojik bariyerlerden geçişlerini kolaylaştırır. Nanomalzemeler vücut içinde tamamen sindirilmeli ve emilmelidir. Kısmen sindirilirse kapsüllenmiş bileşikler tam olarak salınım göstermez. Bu durumda bileşikler hem kapsül hem de bireysel olarak sindirim sisteminden atılabilir veya epitel dokuya geçip kan dolaşımına girerek immünolojik reaksiyonlara neden olabilir (Bazana vd., 2019). Nanokapsüller kan dolaşımına girdiğinde, bağışıklık hücreleri tarafından ortadan kaldırılmasına yardımcı olmak için bir plazma proteinleri tabakası ile kaplanır. Eritrositler ve lökositler gibi kan hücreleri nanopartiküller ile etkileşime girebilir. Daha sonra karaciğer, dalak ve kemik iliği fagositik alım hücreleri tarafından tutularak retiküloendotelial sistemden ayrılırlar. Bu şekilde nanopartiküllerin safra kanalları yoluyla insan vücudundan dışkı veya idrara atılması sağlanmaktadır (Martinez-Munoz vd., 2020).

Nanomalzemelerin çoğunun sitotoksik ve genotoksik özelliklerinin bilimsel temelleri henüz anlaşılmamıştır. Ancak nanomalzemeler oksidatif ve inflamatuvar streslere neden olan biyolojik birikim ile vücut üzerinde kimyasal risk ve nanotoksisite oluşturabilirler (Bazana vd., 2019; Ezhilarashi vd., 2013). Nanotoksisitenin en önemli oluşma mekanizması; reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkması, aşırı üretimi, oksidatif stresi artırması ile normal hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu durum hücrede DNA hasarı, düzensiz hücre sinyali, hücre hareketliliğinde değişiklik, sitotoksisite, apoptoz (programlı hücre ölümü) ve kanser başlangıcına neden olabilir. ROS oluşumunu etkileyecek faktörler; partikül

boyutu, şekli, yüzey yükleri, partikül çözünmesi, kümelenme, hücrelerle etkileşim modu, inflamasyon ve ortam pH'ıdır (Fu vd., 2014).

Toksisite profillerinin belirlenmesi için nanoparçacık boyutu, boyut dağılımı, şekli, aglomerasyon potansiyeli, çözünürlüğü, yüzey yükü, reaktivitesi ve diğer fizikokimyasal parametrelerin yanında nanoparçacıkların tutulduğu biyolojik gıda matrisinden etkilenebilirliği dikkate alınmalıdır (Cushen vd., 2012). Bazı nanoparçacıklar dokular üzerinde iltihaplanma, oksidatif stres ve erken tümör oluşumu belirtilerine neden olabilir. Bazı malzemeler, makro ölçekte değil, nano ölçekte toksisite sergiler.

Yeni gıdalar olarak kabul edilen gıda nanopartiküllerinin güvenlikleri, mevcut toksikolojik ve ekotoksikolojik test yöntemleri ile değerlendirilmez ve bunlar için özel yöntemler geliştirilmelidir (EFSA, 2009). Partikül boyutlarından kaynaklanan farklılıkları hesaba katmak için modifikasyonlar yapılması gerektiği öngörülmektedir (Cushen vd., 2012). Avrupa Sağlık Çevre ve Yeni Ortaya Çıkan Riskler Bilim Komitesi (SCHEER) geleneksel mikro boyutlu malzemeler için mevcut toksisite test yaklaşımlarında kullanım dozu kütle üzerinden hesaplanırken, nanomalzemeler için kütleye ek olarak yüzey alanı ve parçacık sayısı ile birlikte kullanım dozunun hesaplanması gerektiğini ifade etmiştir (SCENIHR, 2009). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), gıda nanopartiküllerinin tüketiminin güvenliği, karakteristik özellikleri ve spesifikasyonları hakkında bir kılavuz yayınlamıştır (Duvall, 2012).

Bugün, gıda nanoparçacıklarının risk değerlendirmesi için küresel bir düzenleme yoktur. Ancak, gıda nanopartikülleri insan sağlığı için tehlikeli olmamalı, gıdanın bileşiminde kabul edilemez bir değişikliğe neden olmamalı ve organoleptik özelliklerde bozulma olmamalıdır. (SCENIHR, 2021).

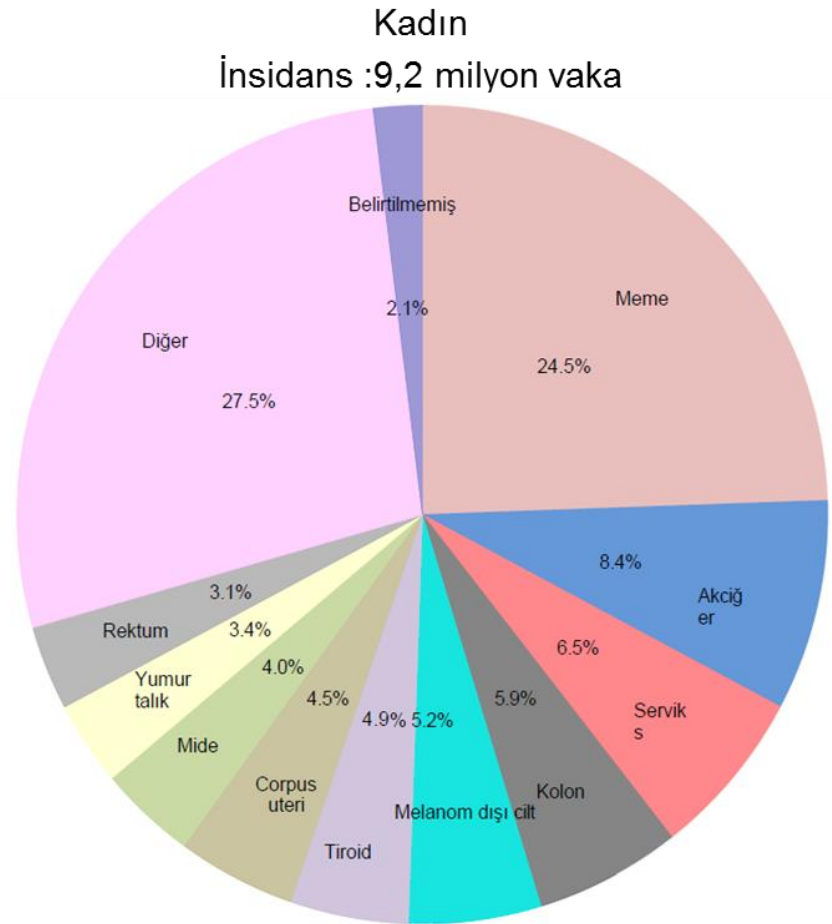
## **2.16. Peptik/Gastrik Ülser & Kanser**

Peptik ülser hastalığı, gastrointestinal sistemde peptik sıvıya maruz kalmış bölgelerdeki ülseri tanımlamaktadır. Peptik ülser özofagus, jejunum ve ileumda görülebildiği gibi en sık mide ve duodenumda görülür (Kılıçarslan vd., 2011). Peptik ülser vakaları dünya nüfusunun yaklaşık %10'unda görülen ve görülme oranı giderek artan en yaygın sindirim bozukluğudur (Jabbar vd., 2023). Peptik ülser, dünya genelinde

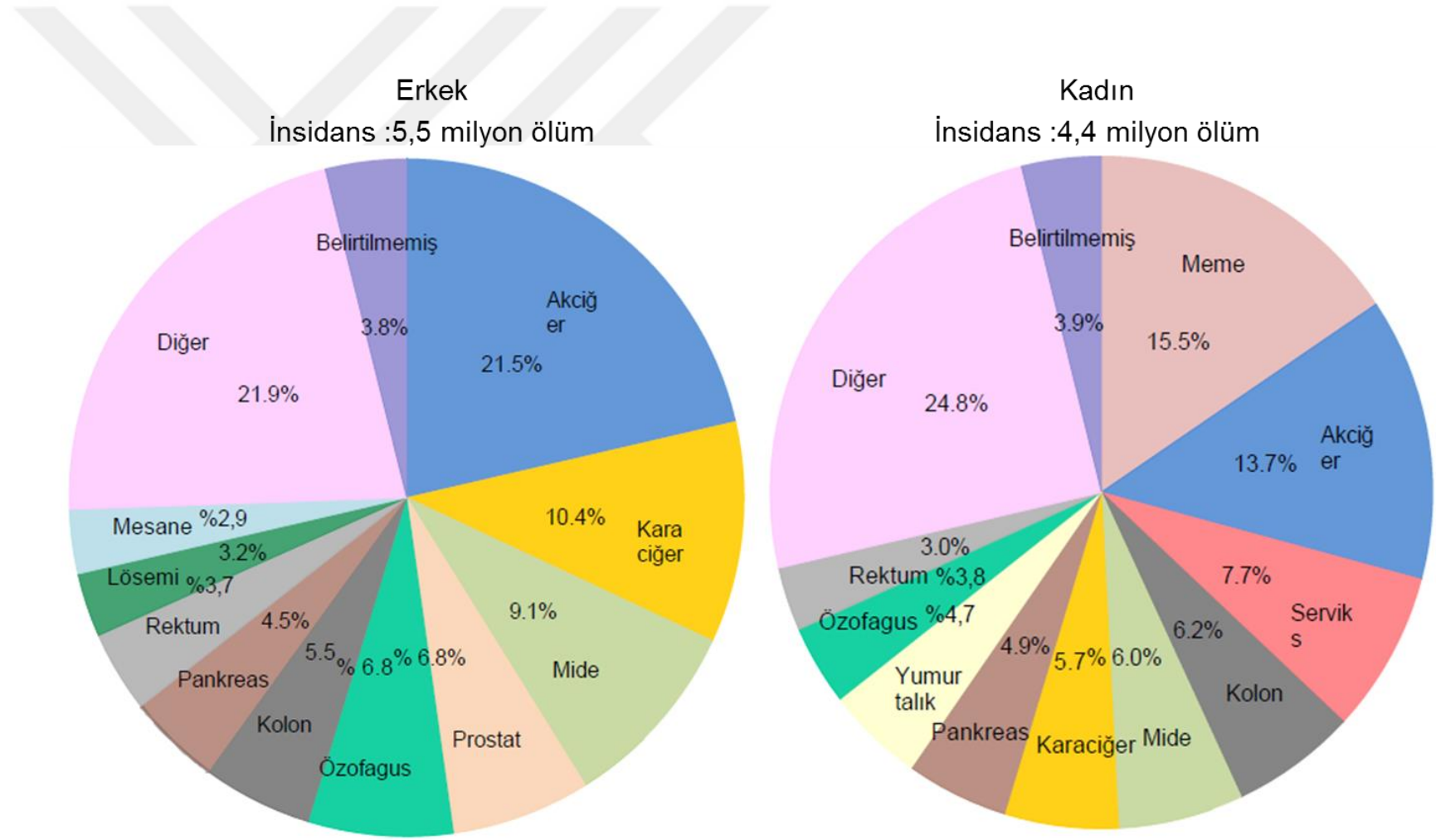
dört milyon insanı etkiler ve coğrafi olarak heterojen bir dağılıma sahiptir (Hamza, 2023). Peptik ülser görülme oranı en yüksek ülkelerin Meksika, Venezuela, Peru, Nijerya, Ruanda, Zambia, Filipinler, Tayland, Kore, Japonya, Çin ve Moğolistan olduğu görülmektedir (Abbasi-Kangevari vd., 2022; Salari vd., 2022).

Gastrik ülser vakaları büyük ölçüde mide sindiriminin yapıcı ve yıkıcı faktörleri arasındaki mekanik dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Yapıcı faktörler: gastrik müsin-prostagladin salgısı, epitel hücre göçü (restitüsyon), hücre replikasyonu ve kan akışını içerirken, yıkıcı faktörler gastrik asit, pepsin salgısı ve *Helicobacter pylori* varlığını içermektedir (Jabbar vd., 2023). Öte yandan, stres, diyetel faktörler, erken yaşta sigara kullanımı, alkol kullanımı, aspirin ve non-steroid antiinflatuar ilaç kullanımı gastro-duodenal ülser hastalığını tetikleyen başlıca dış etmenlerdendir (Çıtlak vd., 2020). Türkiye’de duodenal ülser vakaları en sık 20-50 yaş grubunu, gastrik ülser vakaları ise en sık 30-60 yaş grubunu kapsamaktadır. Duodenal ülser görülme sıklığı erkek/kadın oranı 1,3/1 olarak ve gastrik ülser görülme sıklığı ise kadın ve erkeklerde eşit oranda açıklanmıştır (Kılıçarslan vd., 2011).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan genetik, psikolojik ve çevresel faktörlere bağlı kompleks bir hastalıktır (Baykara, 2016). Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur ve ikinci önde gelen ölüm nedenidir. 2019 yılında görülen Koronavirüs hastalığı (COVID-19) pandemisi, kanser tanı ve tedavi sürecinde gecikmelere neden olmuştur (Siegel vd., 2023). Yaşam boyu (75 yaşından önce) kansere yakalanma riski yaklaşık %20, kanserden ölme riski ise %10’dur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verileri ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC)’nın GLOBOCAN kanser istatistikleri tahminleri doğrultusunda hazırlanan dünya çapında sık görülen 10 kanser türü için 2020 yılında tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı Şekil 2.6’da verilmiştir (Sung vd., 2021).



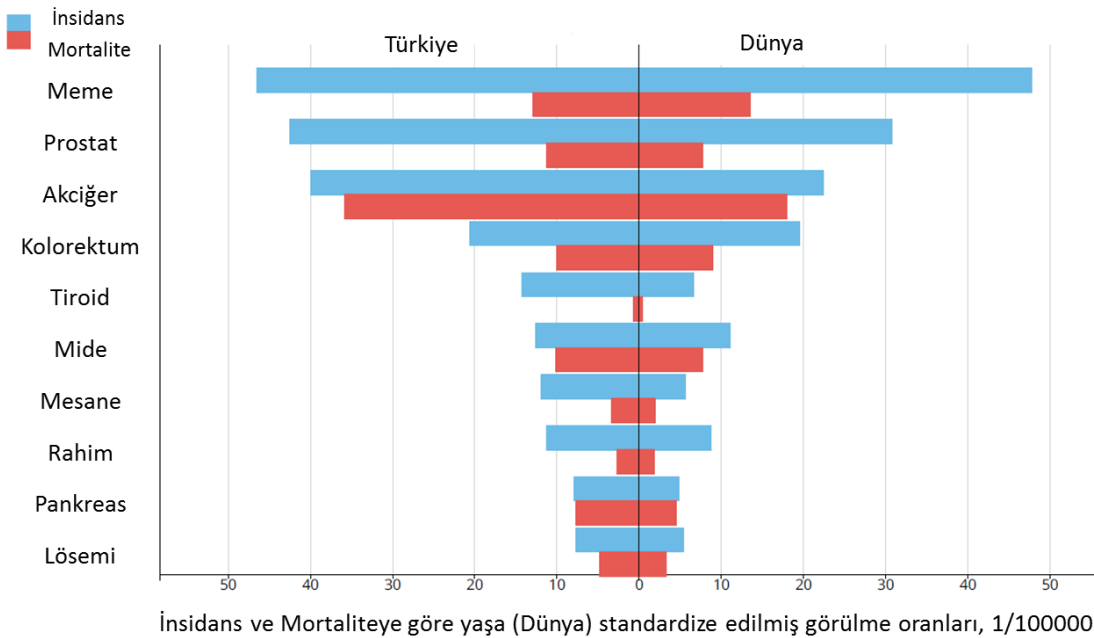
**Şekil 2.6.** Dünya genelinde en yaygın 10 kanser türü için 2020 yılında tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı. Pasta grafiğin alanı toplam vaka veya ölüm sayısının oranını yansıtmaktadır (Sung vd., 2021).



**Şekil 2.6.** Dünya genelinde, en yaygın 10 kanser türü için 2020 yılında tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı. Pasta grafiğin alanı toplam vaka veya ölüm sayısının oranını yansıtmaktadır (Sung vd., 2021). (Devamı)

Dünya genelinde en sık görülen kanser vaka oranları incelendiğinde akciğer kanseri ilk sırada olup, kadınlarda ikinci sırayı meme kanseri, erkeklerde ikinci sırayı ise prostat kanseri almaktadır. Kansere bağlı mortalite oranlarına bakıldığında erkeklerde akciğer kanseri, kadınlarda meme kanseri oranlarının en yüksek olduğu görülmektedir. Ortalama kanser kaynaklı ölüm oranlarının en yaygın olanı başta akciğer kanseri olmak üzere, karaciğer, meme, prostat ve mide kanseri olarak sıralanmaktadır (Ferlay vd., 2021).

Türkiye ve Dünya çapında en yaygın 10 kanser türü için 2020 yılında tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı Şekil 2.7’de verilmiştir. Türkiye’de meme kanseri dağılımı Dünya ile benzer korelasyonda ve en yüksek insidans değerine sahipken, mortalite oranı en yüksek olan kanser türü ise Dünya ile benzer korelasyon görülen akciğer kanseridir. Türkiyede kanser vakaları cinsiyete göre incelendiğinde erkeklerin %74,8’i akciğer kanseri, %42,5 prostat kanseri ve %26,2 kolorektum kanseri iken kadınların %46,6 meme kanseri, %22,4 mide kanseri ve %16,2 kolorektum kanseridir (GCO, 2021).



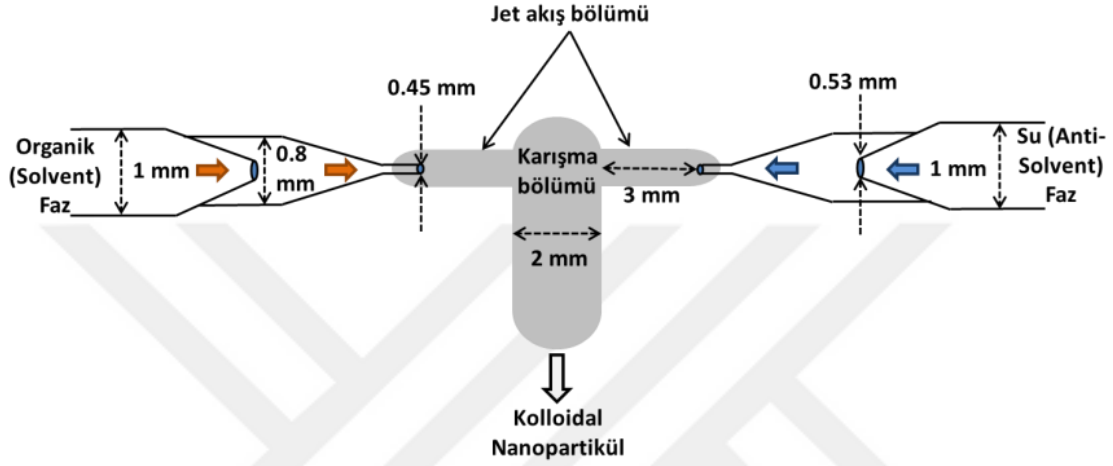
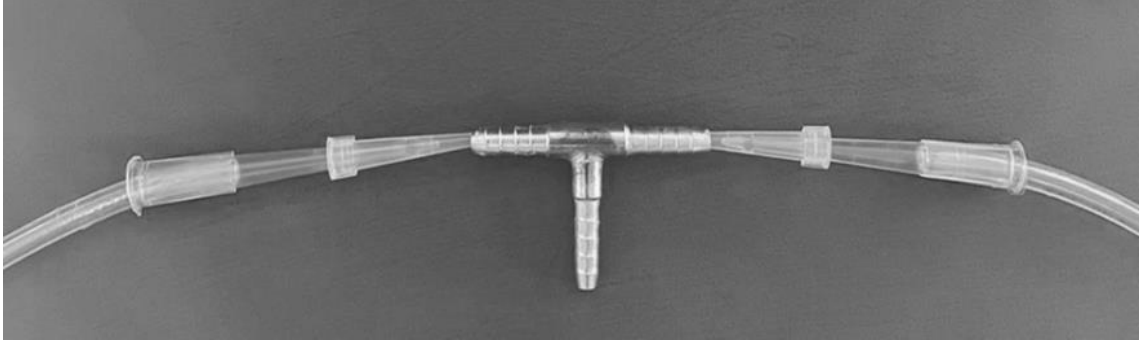
**Şekil 2.7.** Dünya genelinde ve Türkiyede görülen en yaygın 10 kanser türü için 2020 yılına ait tahmini yeni vaka ve ölümlerin dağılımı (GCO, 2021).



### 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez kapsamında, Muğla-Köyceğiz lokasyonundan Orman İşletmeleri Müdürlüğü'nden onaylı yerel bir firmadan (KB-Köyceğiz Balı- Özçakırlar Gıda San. ve Tic.Ltd. Şti.) satın alınan ham sığla balsamı fiziksel, kimyasal ve biyoaktif özellikleri incelenerek tüm çalışmalarda hammadde olarak kullanılmıştır. Sığla balsamının doğal yapısında bulunan safsızlıklar (toz, ağaç kabuğu, kül..vb) ve reçine nanokapsül üretimi işleminde yüzeyde veya dipte ayrışma göstemesi nedeniyle sığla balsamına saflaştırma önışlemi uygulanmış ve tüm nanopartikül üretimlerinde saflaştırma önışleminden geçirilmiş sığla yağı olarak kullanılmıştır. Kaplama materyali olarak kullanılan zein (%98 saflıkta) (CAS:9010-66-6) ve poly-ε-caprolactone (PCL) (Ort Mn: 45,000), stabilizatör olarak kullanılan kitosan (CAS:9012-76-4) ve polivinil alkol (PVA) Sigma Aldrich'den temin edilmiştir. Organik çözücü olarak kullanılan aseton ve etanol HPLC grade IsoLab Chemicals firmasından temin edilmiştir. Hazırlanan tüm çözeltiler PTFE 45 µm şırınga filtresinden geçirilerek kullanılmıştır. Solvent faz enjeksiyonu için termoflex boru (Euroflex tube, 4 mm x 2 mm) ve enjeksiyon pompası Chemyx Fusion 101 kullanılmış ve karıştırmalar ise Jeio Tech (Korea) çok-kanallı manyetik karıtırıcı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm üretimler boyunca ultra saf su 18.2 mΩxcm saflıkta Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) su arıtım cihazından temin edilmiştir. Flaş nanoçöktürme yönteminde, jet akışlı mikroakışkan karıştırma sağlayan sınırlı çarpan jet (SÇJ) karıştırma (confined impinging jets mixer-CIJM) aparatı tasarlanmıştır. SÇJ karıştırma için tasarlanan deneysel aparatın görüntüsü ve boyutları Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Üretilen sığla yağı dolgulu nanokapsüller bekletilmeden -80°C'de 24 saat süresince dondurulmuş ardından, dondurarak kurutucuda Buchi-Lyovapor L-200 (İsviçre) liyofilize edilerek nanopartikül tozları haline getirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Jet akışlı mikroakışkan karıştırma sağlayan sınırlı çarpan jet (SÇJ) karıştırma (confined impinging jets mixer-CIJM) deneysel aparatı ve boyutları

### 3.1.1. Sığla Balsamı Önışlemi

Ticari olarak satın alınan sığla balsamı, insan tüketimine uygun hale getirilmesi için içinde bulunan safsızlıkların (toz, kum, ağaç kabuğu, kül gibi) giderilmesi ve nanopartikül üretimine uygun olmayan vizkoz yapısını oluşturan içeriğindeki yapışkan reçinenin uzaklaştırması amacıyla önışleminden geçirilmiştir. Buna göre, 10 g sığla yağı 5 ml saf aseton ile karıştırılarak 1 dk süreyle vortekslenmiş ardından, 5 ml ultra saf su ilave edilerek tekrar 1 dk süreyle vortekslenmiştir. Karışım 10.000 rpm döndürme hızında 10 dk süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yağ ve su faz ayrımı sağlanarak, yağlı kısım alınıp tekrar 10 ml ultra saf su ile 1 dk süreyle vortekslenmiştir. Ardından, karışım 12.000 rpm döndürme hızında 20 dk süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yağ ve su faz ayrımı sağlanarak, yağlı kısım alınıp 5 ml aseton ile 1 dk süreyle vortekslenmiştir. Elde edilen son karışım Wattman (Grade 595:4-7 $\mu$ m) filtre kağıdı kullanılarak nuçe erleni yardımıyla süzölmüştür. Ardından, 45  $\mu$ m PTFE şırınga

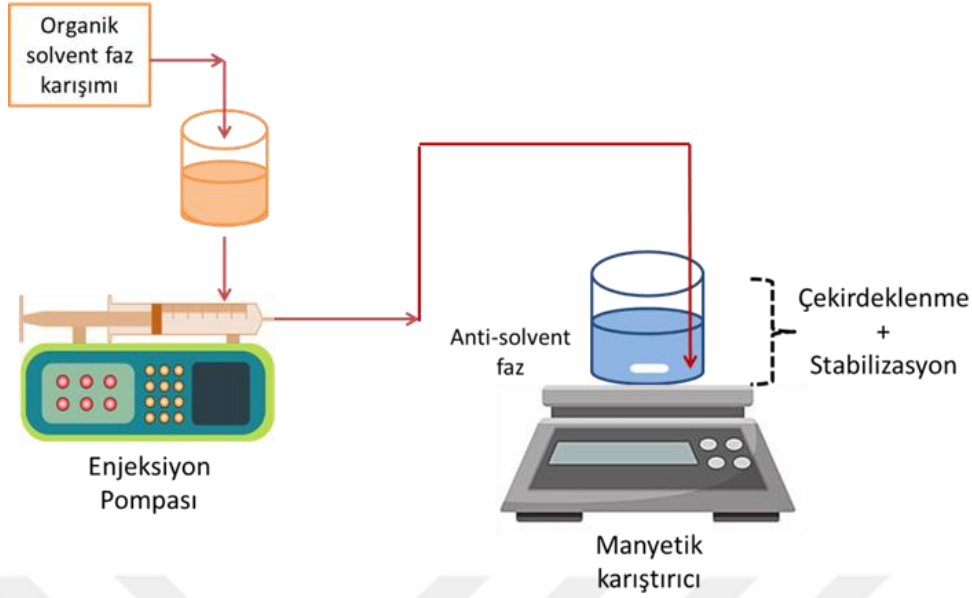
filtrelerinden geçirilerek kullanıma kadar -18°C derecede amber cam şişede stoklanmıştır.

### **3.2. Yöntem**

Sığıla yağı nanoenkapsülasyon çalışması, organik (zein) ve inorganik (poly-ε-caprolactone (PCL)) taşıyıcı polimerleri kullanılarak basit nanoçöktürme ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilmiştir. Zein nanopartiküllerinin üretiminde, basit nanoçöktürme yönteminde herhangi bir stabilizatör kullanılmamış, flaş nanoçöktürme yönteminde ise stabilizatör olarak kitosan kullanılmıştır. PCL nanopartiküllerinin üretiminde ise her iki yöntemde de stabilizatör olarak polivinil alkol PVA kullanılmıştır.

#### **3.2.1. Basit Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi**

Basit nanoçöktürme (BN) yöntemi Zou (2012) ve Patel (2012) tarafından geliştirilen metodların kısmen modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 80:20 (v/v) etanol:ultra saf suda çözünen zein (5-7,5 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda) ve absolut etanolde çözünen sığıla yağı (%0,5-1-2-5-7,5-10), zein:sığıla yağı oranı 2:1 olacak şekilde karıştırılarak organik solvent faz elde edilmiştir. Elde edilen organik solvent fazdan 15 ml şırınga içine doldurularak, ince termofleks boru vasıtasıyla içinde 45 ml ultra saf su (anti-solvent faz) içine belirli bir akış hızı ve manyetik karıştırma altında doğrudan enjekte edilmiştir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Basit nanoçöktürme yöntemi deneysel düzeneği.

Basit nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartiküllerinin üretimi Design-Expert 10 programı kullanılarak optimal (custom) design deneme deseninde oluşturulan plana göre gerçekleştirilmiştir. Bu deneme deseni için seçilen bağımsız işlem değişkenlerinin sınır değerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Basit nanoçöktürme optimal (custom) dizayn için seçilen bağımsız değişkenler ve seviyeleri.

| Yöntem | Bağımsız Değişkenler           | Kodlanmış değerler/Gerçek değerler |      |     |     |     |
|--------|--------------------------------|------------------------------------|------|-----|-----|-----|
|        |                                | -1                                 | -0,5 | 0   | 0,5 | 1   |
| BN     | A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 5                                  | -    | 7,5 | -   | 10  |
|        | B- Styra Liquidus miktarı (%)  | 0,5                                | 1    | 2   | 3   | 5   |
|        | C- Akış hızı (ml/dk)           | 50                                 | -    | 100 | -   | 150 |
|        | D- Karıştırma hızı (rpm)       | 100                                | -    | 200 | -   | 300 |

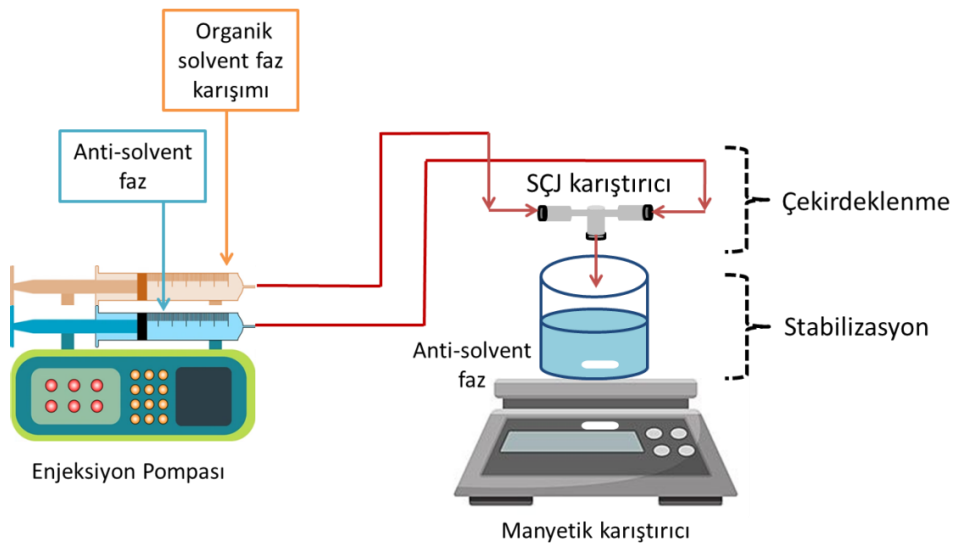
PCL kullanılarak gerçekleştirilen basit nanoçöktürme işleminde ise, aseton içinde çözünen %1’lik (w/v) hazırlanan PCL ve kütlece %0,5-1-2-3-5-7 oranlarında hazırlanan sıgla yağı çözeltileri, PCL:sıgla yağı oranı 7:3 olacak şekilde karıştırılarak organik solvent faz elde edilmiştir. Elde edilen organik solvent fazdan 10 ml şırınga içine doldurularak, ince termofleks boru vasıtasıyla içinde  $4,1 \times 10^{-5}$  g/ml PVA içeren 45 ml deiyonize su (anti-solvent faz) içine sabit 200 ml/dk akış hızında ve 750 rpm sabit manyetik karıştırma altında doğrudan enjekte edilmiştir.

Basit nanoçöktürme işlemi sonrasında elde edilen koloidal süspansiyonlar bekletilmeden  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat süreyle dondurulmuş ve dondurarak kurutucu (Buchi-Lyovapor, L200) kullanılarak liyofilize edilmiştir. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen toz nanopartiküller karakterize edilinceye kadar  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de UV geçirimsiz kapalı cam kaplarda stoklanmıştır.

### 3.2.2. Flaş Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi

Hızlı nanoçöktürme yöntemi olarak adlandırılan flaş nanoçöktürme (FN) yöntemi Han (2012) ve Li (2014) tarafından belirtilen metod modifiye edilerek çalışılmıştır.

Zein kullanılarak gerçekleştirilen flaş nanoçöktürme işleminde organik solvent faz, etanol:ultra saf su oranı 80:20 (v/v) olan çözücüde çözünen zein (5-7-10 mg/ml) ve absolut etanolde çözünen %3-5-7 (w/v) sıgla yağı çözeltileri zein:sıgla yağı oranı 5:2 olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. Daha sonra eşit hacimlerde alınan (herbiri 14 ml) organik solvent faz ve anti-solven faz ( $1,3 \times 10^{-5}$  g/ml kitosan içeren deiyonize su) sınırlı çarpan jet (SÇJ) karıştırıcıya beslenerek jet akışlı karıştırma sağlanmıştır. Burada hızlıca patikül çekirdeklenmesi sağlanarak elde edilen nanokapsüller enjeksiyon pompası yardımıyla aşağıda bulunan anti-solvent faz ( $1,3 \times 10^{-5}$  g/ml kitosan içeren 45 ml deiyonize su) içine belirli akış hızında ve karıştırma altında enjekte edilerek partikül stabilizasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Flaş nanoçöktürme yöntemi deneysel düzeneği.

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartiküllerinin üretimi Design-Expert 10 programı kullanılarak optimal (custom) design deneme deseninde oluşturulan plana göre gerçekleştirilmiştir. Bu deneme deseni için seçilen bağımsız işlem değişkenlerinin sınır değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Flaş nanoçöktürme optimal (custom) dizayn için seçilen bağımsız değişkenler ve seviyeleri.

| Yöntem | Bağımsız Değişkenler           | Kodlanmış değerler/Gerçek değerler |     |      |
|--------|--------------------------------|------------------------------------|-----|------|
|        |                                | -1                                 | 0   | 1    |
| FN     | A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 5                                  | 7,5 | 10   |
|        | B- Styrax Liquidus miktarı (%) | 3                                  | 5   | 7    |
|        | C- Akış hızı (ml/dk)           | 50                                 | 100 | 200  |
|        | D- Karıştırma hızı (rpm)       | 250                                | 500 | 1000 |

PCL kullanılarak gerçekleştirilen flaş nanoçöktürme işleminde organik solvent faz, aseton içinde çözünmüş %1 (w/v) PCL ve aseton çözücüsünde hazırlanan %1-3-5 (w/v) oranında sıgla yağı içeren çözeltiler PCL:sıgla yağı oranı 4:1 olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. Daha sonra eşit hacimlerde alınan (herbiri 15 ml) organik solvent faz ve anti-solven faz ( $4,1 \times 10^{-5}$  g/ml PVA içeren ultra saf su) sınırlı çarpan jet karıştırıcıya beslenerek jet akışlı karıştırma sağlanmıştır. Burada hızlıca patikül çekirdeklenmesi sağlanarak elde edilen nanokapsüller enjeksiyon pompası yardımıyla 200 ml/dk akış hızında doğrudan aşağıda bulunan 1000 rpm sabit karıştırma altındaki  $4,1 \times 10^{-5}$  g/ml PVA içeren 50 ml ultra saf su içine enjekte edilerek partikül stabilizasyonu sağlanmıştır.

Flaş nanoçöktürme işlemi sonrasında elde edilen koloidal süspansiyonlar hızlıca -80 °C’de dondurulmuş ve dondurarak kurutucu (Buchi-Lyovapor, L200) kullanılarak liyofilize edilmiştir. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen toz nanopartiküller karakterize edilinceye kadar -18°C’de UV geçirimsiz kapalı cam kaplarda stoklanmıştır.

### **3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleriyle elde edilen sığla yağı dolgulu/dolgusuz zein ve sığla yağı dolgulu/dolgusuz PCL nanopartiküllerinin morfolojik, fiziksel ve kimyasal olarak karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Morfolojik Analizler**

#### **3.4.1. Partikül Boyutu/Dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ve Zeta Potansiyeli, $\zeta$ (mV) Ölçümü**

Nanopartiküllerin boyutu, dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümleri dinamik ışık saçılım (dynamic light scattering) prensibiyle çalışan Litesizer™ 500 cihazı (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ölçüm ortamı olarak ultra saf su 18.2 M $\Omega$ cm kullanılmıştır.

#### **3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi**

Nanopartiküllerin morfolojik yapıları taramalı elektron mikroskobu (Zeiss-Leo 1430, Germany) kullanılarak incelenmiştir. Dondurarak kurutulmuş toz nanopartiküllerin yüzeyleri elektron iletkenliği kazandırılmak üzere 10 dk süresince altınla kaplanmıştır. Analizler 15 kV voltaj altında ve 6000-15000x büyütme yapılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.3. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi**

Sığla yağı, dolgusuz/dolgulu PCL ve dolgulu/dolgusuz zein nanopartiküllerinin kimyasal yapılarını ve etkileşimlerini belirlemek üzere FTIR spektrumları, Perkin Elmer

(Spectrum 400-FT-IR/NIR spectrometer, USA) cihazı kullanılarak 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  bölge aralığında, 40 tarama yapılarak 4  $\text{cm}^{-1}$  hassasiyetle oda sıcaklığında alınmıştır.

### 3.5. Fiziksel Analizler

Nanopartikül tozlarının fiziksel analizleri, optimum üretim şartlarında elde edilen partiküller üzerinde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.5.1. Renk

Nanopartikül örneklerinin renk değerleri HunterLab (Conica-Minolta CR 400, Sensing, Inc, Japonya) renk ölçüm cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler öncesinde cihaz beyaz kalibrasyon plakası ile kalibre edilmiştir. Ölçüm sonucunda örneklerin renk değerleri  $L^*$  (koyuluk-açıklık),  $a^*$  (yeşillik-kırmızılık) ve  $b^*$  (mavilik-sarıklık) ile ifade edilmiştir. Ölçümler üç defa tekrar edilmiştir.

#### 3.5.2. Nem

Nanopartiküllerin nem değerleri gravimetrik yöntem ile 70°C derecede 24 saat süre etüvde bekletilerek, örnek ağırlığının dengeye geldiği noktadaki ağırlığı ile ilk ağırlığı üzerinden hesaplanmıştır (Şahin-Nadeem vd., 2013).

$$\% \text{ Nem} = (\text{Son ağırlık} - \text{İlk ağırlık} / \text{Örnek ağırlığı}) \times 100$$

#### 3.5.3. Su Aktivitesi

Nanopartiküllerin su aktivitesi ( $a_w$ ) değeri, su aktivitesi tayin cihazı (AquaLab,4TE, ABD) ile oda sıcaklığında ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) ölçülmüştür.

### 3.5.4. Yığın/Sıkıştırılmış Yoğunluk

Nanopartiküllerin yığın yoğunluğu ( $\rho_b$ ) 10 ml'lik mezür içine doldurulan 0,5 g tartılan toz örneğin kütle/hacim oranıyla hesaplanmıştır. Sıkıştırılmış yoğunluk ( $\rho_t$ ) ise mezüre doldurulan toz örneğin içinde hava boşluğu kalmayacak şekilde manuel olarak 100 defa sert bir zemine vurulması sonrası örneğin kütle/hacim oranıyla hesaplanmıştır. Nanoartiküllerin akabilirliği Carr indeks (CI) değerleri ile değerlendirilmiş aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Özdemir, 2022). CI<15 çok iyi, CI=15-20 iyi, CI=20-35 zayıf, ve CI=35-45 kötü, CI>45 çok kötü olarak değerlendirilir (Carr, 1965).

$$CI = [(\rho_t - \rho_b) / \rho_t] \times 100$$

### 3.5.5. Çözünürlük

Nanopartiküllerin çözünürlük analizinde, 0,25 g toz örnek 25 ml saf su ile seyreltilerek 3000 rpm dönme hızında 5 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 3000 rpm dönme hızında 5 dk santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı petri kabına aktarılıp 105°C sıcaklıktaki etüvde 4 sa süresince kurutulmuştur. Çözünürlük yüzdesi, çözünen toz kütlesinin çözelti hacmine oranı yardımıyla hesaplanmıştır (Türker vd., 2018).

### 3.5.6. Ürün verimi

Nanopartiküllerin ürün verimi, son ürün miktarının beslenen karışımdaki kuru madde miktarına oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Sahin-Nadeem ve Özen, 2014).

$$\text{Ürün verimi \%} = [\text{Nanopartikül ürün (gr)} / \text{Süspansiyon kuru madde miktarı(g)}] \times 100$$

### 3.6. Kimyasal Analizler

#### 3.6.1. Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği, polimer matris içinde kapsüllenmiş aktif bileşen (çekirdek) ve kapsüllenmemiş aktif bileşen (serbest) arasındaki fark olarak tanımlanır. Nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri aktif bileşen sığla yağı (SL) içindeki baskın bileşik olan trans-sinamik asit üzerinden yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (LC-20AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) kullanılarak hesaplanmıştır (Zhang vd., 2019). Kapsüllenmiş, toplam SL oranı için nanopartiküller, %80 (v/v) etanol-su (%0,1 HCL içeren) ile 1:10 oranında karıştırılıp 10 saniye vortekslelendikten sonra 60°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Kapsüllenmemiş, yüzey SL oranını belirlemek için nanopartiküller, saf etanolle 1:10 oranında karıştırılıp 3 saniye vortekslenmiştir. Toplam ve yüzey olarak ekstrakte edilen örnekler 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra HPLC'de analiz için 0.45 µm'lik PTFE şırınga filtresi ile filtrelenmiştir.

HPLC çalışma şartları, ODS-C18 kolon kullanılarak 30°C fırın sıcaklığında, 0,750 ml/dk akış hızında ve 20 µl enjeksiyon hacminde 50 dakika boyunca solvent A[%2'lik asetik asit-ultra saf su] ve solvent B[70:30 Asetonitril:ultra saf su] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gradyan elüsyon koşulunda 3 dakika süreyle 95:5 (A:B), 10 dakikaya kadar 80:20 (A:B), 20 dakikaya kadar 60:40 (A:B), 30 dakikaya kadar 20:80 (A:B), 50 dakikaya kadar 5:95 (A:B) takip eden karışımlarda gerçekleştirilmiştir. Tüm kromatogramlar 280 nm dalga boylarında değerlendirilmiş ve trans-sinamik asit miktarları standart çözeltinin alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Trans sinamik asit standardı kalibrasyon eğrisi ( $y=237340x+155677$ ,  $R^2=0,999$ ) üzerinden sığla yağı (SL) miktarı belirlenmiş, enkapsülasyon etkinliği aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EE \% = [(T_{SL}-Y_{SL})/T_{SL}]\times 100$$

$T_{SL}$ : Toplam kapsüllenen sığla yağı (SL) miktarı

$Y_{SL}$ : Yüzeyde kapsüllenmeyen sığla yağı (SL) miktarı

### 3.6.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Enkapsülasyon etkinliği tayininde belirtildiği gibi ekstraksiyonları gerçekleştirilen tozların toplam fenolik madde miktarları Özdemir (2022) tarafından belirtilen metod ile belirlenmiştir. Buna göre 0,5 ml ekstrakt 2,5 ml %10'luk Folin-Ciocalteu çözeltisi içine ilave edildikten sonra üzerine 2 mL %7,5'luk (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra karışım 5 dk süreyle 50°C derecedeki su banyosunda bekletilmiş ardından 10 dk oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. UV-spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuş ve toplam fenolik madde miktarları gallik asit standart eğrisi ( $y=0,0119x-0,0044$ ,  $R^2=0,9997$ ), kullanılarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak tespit edilmiştir.

### 3.6.3. Antioksidan Aktivite Tayini

Ekstrakte edilen örneklerin antioksidan aktivite tayini DPPH radikal inhibisyonu üzerinden Özdemir (2022) tarafından belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 50 µl ekstrakt 950 µl  $6 \times 10^{-5}$  M DPPH çözeltisi içine eklenmiştir. Karanlık bir ortamda 30 dk bekletildikten sonra 516 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuş ve antioksidan aktivite miktarı Troloks standart eğrisi ( $y=0,0104x-0,0514$ ,  $R^2=0,9964$ ), kullanılarak mg Troloks eşdeğeri (TE)/g örnek olarak tespit edilmiştir.

Ekstrakte edilen örneklerin antioksidan aktivite tayini ABTS serbest radikal giderim yöntemi üzerinden de belirlenmiştir (Re vd., 1999). ABTS<sup>•+</sup> radikali, 7 mM ABTS çözeltisi ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturulmuş ve 12 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiştir. Hazırlanan radikal çözeltisi kullanılmadan önce etanolle (0,1 M, pH=7.4) seyreltilerek 734 nm dalga boyunda başlangıç absorbans değeri  $0,700 \pm 0,025$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından, 0.9 mL ABTS çözeltisi, 0,1 ml ve 0,2 ml ekstraktlara (100 - 200 µg/mL) eklendikten sonra 15 dk karanlıkta bekletilmiş ve 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Antioksidan aktivite sonuçları Trolox eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

#### 3.6.4. *İn Vitro* Sindirim Analizi

Enkapsüle nanopartiküllerin, ağız, mide ve bağırsak sindirim ortamlarındaki analizleri Minekus (2014) tarafından belirtilen metodun modifiye edilmesiyle statik *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli ile gerçekleştirilmiştir. Ağız, mide ve bağırsak stok çözeltileri uygun pH ve enzim kombinasyonları ile hazırlanarak sırasıyla ağız sindirim sıvısı (ASS), mide sindirim sıvısı (MSS) ve bağırsak sindirim sıvısı (BSS) olarak adlandırılmıştır.

Buna göre, ASS için 290 mg  $\alpha$ -amilaz, 10 ml KCl (0,5 mL/L), 10 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 mL/L), 1.7 mL NaCl (2 mol/L), 20ml  $\text{NaHCO}_3$  (1mol) /L, 10 mL of  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (0,5 mol/L) çözeltileri içinde tamamen çözündürülmüş, pH 7.0'ye ayarlanmıştır. ASS, 38°C derece sıcaklıkta su banyosunda 20 dk bekletildikten sonra 0,2 g toz örnek üzerine 1:10 oranında ilave edilmiş ve ardından 38°C derece sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma altındaki su banyosunda 20 saniye süreyle inkübe edilmiştir. Ağız sindirimi sonrası çözeltiden 500  $\mu\text{l}$  alınmış ve 1500  $\mu\text{l}$  absolute etanol üzerine enjekte edilerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır.

MSS için 1,6 g pepsin 1 g NaCl, 3,5 ml HCl (36.46 g/mol) içeren 500 ml hacimli deiyonize su içinde tamamen çözündürülmüş, pH 1,2'ye ayarlanmıştır. MSS, 38°C derece sıcaklıkta su banyosunda 20 dk bekletildikten sonra 0,2 g toz örnek üzerine 1:10 oranında ilave edilmiş ve ardından 38°C derece sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma altındaki su banyosunda 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Mide sindirimi sonrası çözeltiden 500  $\mu\text{l}$  alınmış ve 1500  $\mu\text{l}$  absolute etanol üzerine enjekte edilerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır.

MSS içinde 2 saat süresince zamana bağlı salınım profili, optimum nanopartikül tozları kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla, 0,25 g toz örnek üzerine MSS eklendikten sonra belirli aralıklarla (15 dk-30 dk-45 dk-60 dk-75 dk-90 dk ve 120 dk) çözeltiden 200  $\mu\text{l}$  alınmış ve 600  $\mu\text{l}$  absolute etanol üzerine enjekte edilerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır.

BSS için, 6,67g pankreatin, 4,53 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 51,3 mL NaOH (0,2 N) ile hazırlanan ve 500 mL hacim elde etmek için saf su ile tamamlanan çözelti pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır. Stok BSS çözeltisi 38 °C derece sıcaklıktaki su banyosunda 20 dk bekletildikten sonra 0,2 g toz örnek üzerine 1:10 oranında ilave edilmiş ve ardından 38°C derece sıcaklıkta

ve 100 rpm karıştırma altındaki su banyosunda 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bağırsak sindirimi sonrası çözeltiden 500 µl alınmış ve 1500 µl absolute etanol üzerine enjekte edilerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır.

Enzim aktiviteleri sonlandırılan çözeltiler 4000 rpm dönme hızında 5 dk süreyle santrifüj edildikten sonra üstteki süpertanant alınarak 0,45 µm şırınga filtresinden geçirilmiş ve sindirim ortamında salınan trans-sinamik miktarları belirlenmesi için HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

### **3.7. Biyolojik Aktivite Özellikleri**

#### **3.7.1. Anti Ülseratif Etki**

Ham sıgla balsamı, saflaştırma önışleminden geçirilmiş sıgla yağı ve optimum nanopartiküllerin antiülserojenik etkileri, üreaz inhibisyon aktivitesi üzerinden indofenol metodu kullanılarak reaksiyon sonucunda oluşan amonyağın ölçülmesi yoluyla spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir (Weatherburn, 1967). Substrat olarak üre kullanılmış ve 96 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna farklı konsantrasyonlardaki örneklerden 10 µL, 25 µL, 50 µL, 100 µL ve 200 µL üreaz enzimi çözeltisinden (pH = 8,2 fosfat tamponunda çözülecektir) ve 50 µL üre ilave edilmiştir. Kontrol olarak 10 µL tiyoüre kullanılmıştır. 30°C'de 15 dk. inkübasyona bırakılan ve akabinde fenol ve sodyumnitropurissit içeren fenol reaktifinden 45 µL, sodyumhidroksit ve sodyumhipokloröz içeren alkali reaktifinden 70 µL eklenerek 50 dakika sonra 96 kuyucuklu mikrolaka kullanılarak 630 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek % inhibisyon ve IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

### 3.7.2. Anti Karsinogenik Etki

Ham sığla yağı hücre kültürü ve sitotoksikite çalışması değişen dozlarda LNCaP ve PC3 insan prostat kanseri hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Zamana ve doza bağlı olarak prostat kanseri hücre canlılığı tespiti ve hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub> dozu) bulunması için XTT hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Bu test, suda eriyebilen bir bileşik olan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. Ham sığla yağının LNCaP ve PC-3 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL'lik çalışma konsantrasyonları aralığında ve 24 - 48 saat muamele sonrası elde edilen hücre canlılığı (%) bulguları üzerinden incelenmiştir.

### 3.8. Duyusal Analiz

Tez kapsamında üretilen optimum sığla yağı dolgulu zein nanopartikül tozlarının yeni bir ürün olarak tüketiciler tarafından ne oranda beğenileceği/beğenilmeyeceği yapılan duyusal testle belirlenmiştir. Duyusal panel Akdeniz Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde görev yapan lisansüstü öğrenciler ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, panelistlerden doğrudan ham sığla yağı (kontrol) ve basit-flaş nanoçöktürme yöntemleri ile üretilen optimum sığla yağı dolgulu zein nanopartikül tozları renk, topaklanma, sığla yağı lezzet yoğunluğu, ağızda hissedilen doku ve yabancı lezzet kategorilerini genel beğeni açısından 1 (Aşırı kötü) - 5 (Mükemmel) arasında puanlamaları istenmiştir. Puanlama skalasında her bir rakamın karşılık geldiği skala form üzerinde belirtilmiştir. Elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi için istatistiki hesaplamalar SAS, Institute (Cary, NC, ABD) tarafından hazırlanan "The SAS system for Windows V7" paket programı kullanılarak varyans analizi gerçekleştirilmiştir ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılmıştır.

### 3.9. İstatistiksel Analiz ve Optimizasyon

İstatistiksel analizler ve optimizasyonlar Design Expert Version 13.0 (Statease Inc.) paket programı yardımıyla yapılmıştır. Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleriyle zein nanopartikülleri üretiminde proses değişkenlerinin optimizasyonunda, yanıt-yüzey bölümü D-optimal (custom) random design seçilmiştir. D-optimal random dizaynda, bağımsız proses değişkenleri olarak zein konsantrasyonu, sıgla yağı oranı, organik faz akış hızı ve karıştırma hızı seçilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyelleri, enkapsülasyon etkinlikleri ve *in vitro* ağız ve mide ortamlarındaki salınımları yanıt olarak incelenmiştir.

Zein nanopartiküllerin özelliklerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ve optimizasyon çalışmasında proses değişkenleri ile her bir yanıt arasındaki ilişkiyi ifade eden matematiksel model quadratik regresyon analizi yapılarak oluşturulmuştur. Bunun için seçilen modellere her bir değişkenin lineer etki terimleri, daha sonra quadratik etki terimleri eklenerek kareler toplamındaki artış ve model uygunsuzluğu testi (lack of fit) değerleri analiz edilmiştir. Etkilerin istatistiksel olarak model açısından önemliliği  $F$  ve  $p$ -değerlerinden bulunmuştur. İdeal model, matematiksel formunun uygunsuzluğu (Lack of fit) için önemsiz ve regresyon modeli için önemli olması gerekmektedir. Proses değişkenleri quadratik (ikinci dereceden) fonksiyon olarak yer almaktadır ve  $p < 0,05$  olan durumlar modele uygun olarak kabul edilmiştir.

Modellerin deneysel verilere uygunluğu, regresyon katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş regresyon katsayısı ( $R^2_{adj}$ ) ve varyasyon katsayısı (C.V.) hesaplanarak ANOVA tablolarında özetlenmiştir. Regresyon katsayıları ( $R^2$ ) yüksek olan modeller istatistiksel olarak verileri açıklayıcı özelliktedir. Regresyon katsayısı ( $R^2$ ) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ( $R^2_{adj}$ ) değerleri arasındaki fark modelde istatistiksel olarak önemsiz terimlerin var olduğunu ve düşük fark olması modelin etkili olduğunu göstermektedir.

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleriyle PCL nanopartikülleri üretiminde, sıgla yağı oranının nanoenkapsülasyon işlemine etkisi incelenmiş elde edilen ürünlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik aktivite karakteristikleri değerlendirilmiştir. Deneysel verilerin karşılaştırılabilmesi için istatistiki hesaplamalar SAS, Institute (Cary, NC, ABD) tarafından hazırlanan “The SAS system for Windows V7” paket programı

kullanılarak varyans analizi gerçekleştirilmiştir ve ortalamalar Duncan oklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılmıştır.

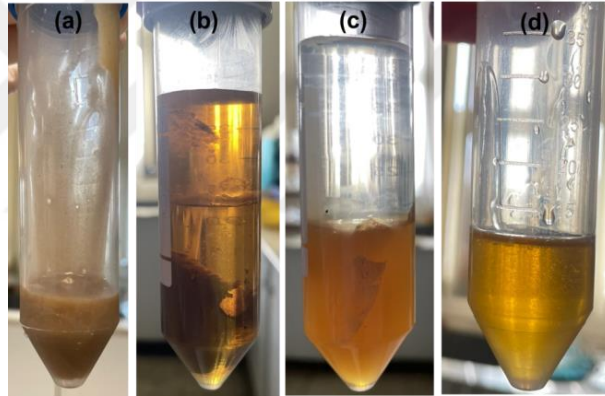
Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleriyle elde edilen optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin fiziksel, kimyasal, biyolojik aktivite ve duyuasal analizleri incelenmiştir. Deneysel verilerin karşılaştırılabilmesi için istatistiki hesaplamalar SAS, Institute (Cary, NC, ABD) tarafından hazırlanan “The SAS system for Windows V7” paket programı kullanılarak varyans analizi gerçekleştirilmiştir ve ortalamalar Duncan oklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılmıştır.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Sığla Yağı Saflaştırma Önişlemi

Sığla balsamı içindeki safsızlıklar ve viskoz reçine sırasıyla aseton ve su çözümleri yardımıyla iki defa yıkanması ardından kısmen giderilmiş, santrifüj yardımıyla birbirinden ayrılan yağ-çözücü fazlarından yağ fazı alınarak nanoçöktürme yöntemiyle nanoenkapsülasyon işleminde ham sığla yağı olarak kullanılmıştır (Resim 4.1).



**Resim 4.1.** Sığla balsamı saflaştırma önişlemi sürecinde: (a) ham sığla balsamı, (b) dipte safsızlıklar, (c) yağ-çözücü fazları ve (d) saflaştırma önişlemi sonrası sığla yağı.

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile elde edilen kolloidal süspansiyon halindeki sığla yağı dolgulu nanokapsüllerin üretilir üretilmez partikül boyutu, PDI, geçirgenlik (transmittans) ve zeta potansiyel ölçümleri Litesizer™ 500 cihazı (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm esnasında seyreltme işlemi için ultra saf su (18.2 MΩxcm) kullanılmıştır. Partikül boyutu, polidispersite indeksi, geçirgenlik ve zeta potansiyeli tespitinde aynı numune üzerinde üç ölçüm alınmış ve sonuçlarda ortalama değerleri bildirilmiştir. Kolloidal partiküller üretildikten hemen sonra -80°C’de dondurulmuş ve ardından liyofilize edilmiştir.

Saflaştırma önişlemi uygulanmış sığla yağının, ham sığla yağına göre antioksidan aktivite, toplam fenolik madde miktarı ve trans-sinamik asit miktarı özelliklerindeki değişim Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Ham sığla yağı ve saflaştırma önişleminden geçirilmiş sığla yağının kimyasal analiz sonuçları

| Örnek                                      | DPPH<br>(mg Toroloks/g) | Toplam fenolik madde<br>miktarı (mg GAE/g) | Trans-sinamik asit<br>miktarı (mg/g) |
|--------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------|
| Ham sığla yağı                             | 7,48±4,50               | 17.96±0.30                                 | 29.01±0.02                           |
| Saflaştırma önişlemi<br>sonrası sığla yağı | 7,07±2,29               | 26.40±0.17                                 | 22.33±0.00                           |

Çizelge 4.1’deki sonuçlar incelendiğinde, ham sığla yağı ve saflaştırma önişlemi sonrası elde edilen sığla yağı antioksidan aktivite değerlerinin benzer bulunduğu görülmüştür. Toplam fenolik madde miktarında gözlenen artış, saflaştırma önişlemi sonrası giderilen safsızlıkların ham sığla yağı içinde bulunan mevcut fenolik bileşik oranını matematiksel olarak artmasından kaynaklanmıştır. Ham sığla yağı içeriğinde tespit edilen trans-sinamik asit oranının saflaştırma önişlemi uygulanması sonucunda yaklaşık %23 oranında azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, nanoenkapsülasyon çalışması süresince saflaştırma önişleminden geçirilen sığla yağı kullanılmıştır.

#### 4.2. Zein Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu ve Optimizasyonu

Zein, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu ve farklı çözücülerde çeşitli nanoyapılar oluşturma yeteneğine sahip doğal bir protein (Paliwal vd., 2014). Gıda ve ilaç endüstrilerinde enzim, ilaç ve uçucu yağ gibi bileşenleri, çeşitli yöntemlerle nanokapsülleme ve salınım çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Shirhir vd., 2018).

Çekirdeğinde sığla yağı içeren ve taşıyıcı biyopolimer olarak hidrofobik zein kullanılan nanopartiküllerin basit nanoçöktürme yöntemi ile sentezlenmesi herhangi bir stabilizatör kullanılmadan gerçekleştirilmiştir. Basit nanoçöktürme yöntemi için belirlenen bağımsız işlem değişkenleri zein konsantrasyonu, sığla yağı oranı, organik

faz akış hızı ve karıştırma hızından oluşmaktadır. Buna göre proses değişkenleri sınır koşullarından zein konsantrasyonu 5-7,5-10 mg/ml olarak, sıgla yağı oranı %0,5-1-2-5-7,5-10 olarak, organik faz akış hızı ve karıştırma hızı sırasıyla, 50-100-150 ml/dk ve 100-200-300 rpm olarak belirlenmiştir. Bu yöntem için optimum üretim koşulları Design Expert programı kullanılarak optimal (custom) deneme desenine göre nanopartikül üretimi için seçilen bağımsız değişkenlerin sınır değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Basit nanoçöktürme sıgla yağı dolugulu zein nanopartikülleri üretimi deneme deseni (optimal custom design).

| Run | Zein konsantrasyonu<br>(mg/ml) | Sıgla yağı (%) | Akış hızı (ml/dk) | Karıştırma hızı<br>(rpm) |
|-----|--------------------------------|----------------|-------------------|--------------------------|
| 1   | 10                             | 5              | 50                | 200                      |
| 2   | 5                              | 5              | 150               | 200                      |
| 3   | 7,5                            | 10             | 100               | 200                      |
| 4   | 10                             | 5              | 100               | 100                      |
| 5   | 10                             | 0,5            | 150               | 300                      |
| 6   | 10                             | 5              | 100               | 100                      |
| 7   | 7,5                            | 7,5            | 50                | 200                      |
| 8   | 10                             | 10             | 50                | 100                      |
| 9   | 10                             | 10             | 150               | 200                      |
| 10  | 5                              | 10             | 150               | 100                      |
| 11  | 7,5                            | 5              | 150               | 300                      |
| 12  | 5                              | 5              | 100               | 300                      |
| 13  | 7,5                            | 1              | 150               | 100                      |
| 14  | 5                              | 2              | 100               | 200                      |
| 15  | 5                              | 10             | 50                | 300                      |
| 16  | 5                              | 7,5            | 50                | 100                      |
| 17  | 7,5                            | 10             | 100               | 200                      |
| 18  | 7,5                            | 5              | 50                | 100                      |
| 19  | 10                             | 5              | 50                | 200                      |
| 20  | 10                             | 0,5            | 50                | 100                      |
| 21  | 10                             | 10             | 100               | 300                      |
| 22  | 5                              | 2              | 100               | 200                      |
| 23  | 7,5                            | 10             | 100               | 200                      |
| 24  | 7,5                            | 1              | 50                | 300                      |
| 25  | 5                              | 10             | 150               | 300                      |

Sıgla yağı içeren zein nanopartiküllerinin flaş nanoçöktürme yöntemi ile sentezlenmesinde stabilizatör olarak sabit oranda kitosan kullanılmıştır. Flaş nanoçöktürme yöntemi için belirlenen bağımsız işlem değişkenleri zein konsantrasyonu, sıgla yağı oranı, organik faz akış hızı ve karıştırma hızından oluşmaktadır. Buna göre proses değişkenleri sınır koşulları zein konsantrasyonu 5-7,5-10 mg/ml olarak, sıgla yağı oranı %3-5-7 olarak, organik faz akış hızı ve karıştırma hızı sırasıyla, 50-100-200

ml/dk ve 250-500-1000 rpm olarak belirlenmiştir. Bu yöntem için optimum üretim koşulları Design Expert programı kullanılarak optimal (custom) deneme desenine göre nanopartikül üretimi için seçilen bağımsız değişkenlerin sınır değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Flaş nanoçöktürme sıgla dolugulu zein nanopartikülleri üretimi deneme deseni (optimal custom design).

| Run | Zein konsantrasyonu (mg/ml) | Sıgla yağı (%) | Akış hızı (ml/dk) | Karıştırma hızı (rpm) |
|-----|-----------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|
| 1   | 5                           | 5              | 200               | 250                   |
| 2   | 5                           | 3              | 100               | 500                   |
| 3   | 7,5                         | 7              | 200               | 500                   |
| 4   | 7,5                         | 7              | 100               | 250                   |
| 5   | 7,5                         | 3              | 200               | 500                   |
| 6   | 7,5                         | 5              | 100               | 500                   |
| 7   | 7,5                         | 5              | 100               | 500                   |
| 8   | 5                           | 5              | 200               | 1000                  |
| 9   | 7,5                         | 7              | 100               | 1000                  |
| 10  | 7,5                         | 5              | 100               | 500                   |
| 11  | 10                          | 5              | 200               | 250                   |
| 12  | 5                           | 5              | 50                | 250                   |
| 13  | 10                          | 5              | 200               | 1000                  |
| 14  | 10                          | 5              | 100               | 250                   |
| 15  | 7,5                         | 5              | 100               | 500                   |
| 16  | 10                          | 7              | 50                | 500                   |
| 17  | 5                           | 7              | 50                | 500                   |
| 18  | 7,5                         | 3              | 50                | 1000                  |
| 19  | 10                          | 3              | 100               | 500                   |
| 20  | 7,5                         | 7              | 100               | 250                   |
| 21  | 7,5                         | 3              | 50                | 250                   |
| 22  | 5                           | 7              | 200               | 500                   |
| 23  | 7,5                         | 7              | 50                | 500                   |
| 24  | 7,5                         | 3              | 200               | 500                   |
| 25  | 5                           | 5              | 100               | 1000                  |

Bağımsız işlem değişkenlerinin basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolugulu zein nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), geçirgenlik (transmittans), zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği (EE) ve statik *in vitro* sindirim (ağız ve mide) ortamlarında sıgla yağı salınımları üzerine etkileri incelenmiştir. Bağımsız proses değişkenlerinin yanıtlar üzerindeki etkisi regresyon analizi ile modellenmiştir. Elde edilen deneysel yanıtlar Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

**Çizelge 4.4.** Basit nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ve dolgusuz ZNP'nin optimal (custom) deneme deseni izlenerek elde edilen deneysel sonuçlar

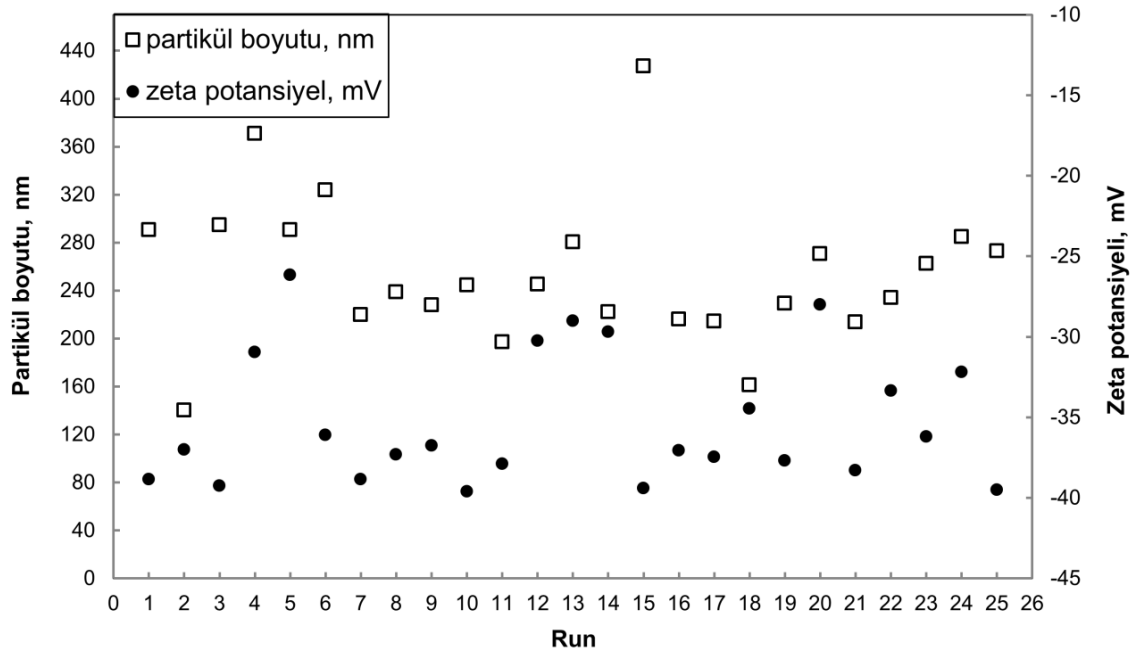
| Run                 | Partikül boyutu (nm) | PDI (%)   | Geçirgenlik (%) | Zeta potansiyeli (mV) | EE (%)     | Ürün verimi (%) |
|---------------------|----------------------|-----------|-----------------|-----------------------|------------|-----------------|
| <b>Dolgusuz ZNP</b> | 112,40±1,20          | 0,15±0,01 | 100             | -27,05±0,63           | -          | -               |
| <b>1</b>            | 290,60±0,14          | 0,20±0,07 | 100±0,00        | -38,85±0,07           | 59,38±1,03 | 80,01           |
| <b>2</b>            | 140,31±1,07          | 0,21±0,04 | 100±0,00        | -37,00±0,71           | 32,02±5,33 | 77,24           |
| <b>3</b>            | 294,60±2,40          | 0,21±0,04 | 100±0,00        | -39,25±0,07           | 39,83±2,53 | 68,46           |
| <b>4</b>            | 376,40±0,28          | 0,17±0,01 | 100±0,00        | -30,95±0,07           | 44,81±5,40 | 79,79           |
| <b>5</b>            | 290,55±2,33          | 0,26±0,01 | 100±0,00        | -26,15±0,49           | 75,87±7,92 | 86,51           |
| <b>6</b>            | 323,70±0,42          | 0,12±0,08 | 100±0,00        | -36,10±0,00           | 62,18±0,55 | 75,07           |
| <b>7</b>            | 219,95±2,62          | 0,19±0,06 | 80±0,00         | -38,85±0,07           | 44,60±0,82 | 67,27           |
| <b>8</b>            | 238,70±2,69          | 0,10±0,08 | 80±0,00         | -37,30±0,57           | 43,10±0,07 | 72,87           |
| <b>9</b>            | 228,00±1,27          | 0,27±0,01 | 60±0,00         | -36,75±0,07           | 52,76±4,04 | 78,14           |
| <b>10</b>           | 244,60±2,12          | 0,17±0,06 | 90±0,00         | -39,60±0,00           | 23,87±5,27 | 69,68           |
| <b>11</b>           | 197,50±1,84          | 0,23±0,01 | 80±0,00         | -37,90±0,14           | 52,70±0,47 | 77,70           |
| <b>12</b>           | 245,25±0,07          | 0,16±0,04 | 86±0,06         | -30,25±0,21           | 32,02±6,60 | 70,81           |
| <b>13</b>           | 280,30±2,55          | 0,18±0,07 | 100±0,00        | -29,00±0,14           | 63,78±1,04 | 76,53           |
| <b>14</b>           | 222,15±3,32          | 0,23±0,01 | 90±0,00         | -29,70±0,85           | 65,59±1,25 | 81,33           |
| <b>15</b>           | 427,40±1,70          | 0,23±0,01 | 60±0,00         | -39,40±0,00           | 47,58±0,73 | 67,91           |
| <b>16</b>           | 216,25±0,35          | 0,20±0,06 | 96±0,06         | -37,05±0,07           | 26,68±0,99 | 66,20           |
| <b>17</b>           | 214,40±0,00          | 0,21±0,02 | 100±0,00        | -37,45±0,35           | 36,60±2,52 | 74,25           |
| <b>18</b>           | 161,16±4,13          | 0,17±0,05 | 100±0,00        | -34,45±0,21           | 36,68±4,62 | 72,34           |
| <b>19</b>           | 229,35±1,06          | 0,15±0,01 | 80±0,00         | -37,70±0,14           | 73,57±1,14 | 79,96           |
| <b>20</b>           | 270,55±4,17          | 0,23±0,05 | 100±0,00        | -28,00±0,42           | 72,30±1,24 | 62,22           |
| <b>21</b>           | 213,55±0,35          | 0,17±0,03 | 100±0,00        | -38,30±0,28           | 35,94±3,86 | 71,10           |
| <b>22</b>           | 233,85±1,20          | 0,19±0,04 | 100±0,00        | -33,35±0,21           | 61,93±6,29 | 64,73           |
| <b>23</b>           | 262,40±0,28          | 0,25±0,00 | 100±0,00        | -36,20±0,00           | 36,89±2,93 | 74,96           |
| <b>24</b>           | 285,24±2,72          | 0,14±0,01 | 86±0,06         | -32,20±0,57           | 64,07±3,19 | 78,30           |
| <b>25</b>           | 272,75±1,34          | 0,24±0,00 | 73±0,06         | -39,50±0,00           | 35,02±6,13 | 73,13           |

Bağımsız işlem değişkenlerinin flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), geçirgenlik (transmittans), zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği (EE) ve statik *in vitro* sindirim (ağız ve mide) ortamlarında sıgla yağı salınımları üzerine etkileri incelenmiştir. Bağımsız proses değişkenlerinin yanıtlar üzerindeki etkisi regresyon analizi ile modellenmiştir. Elde edilen deneysel yanıtlar Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

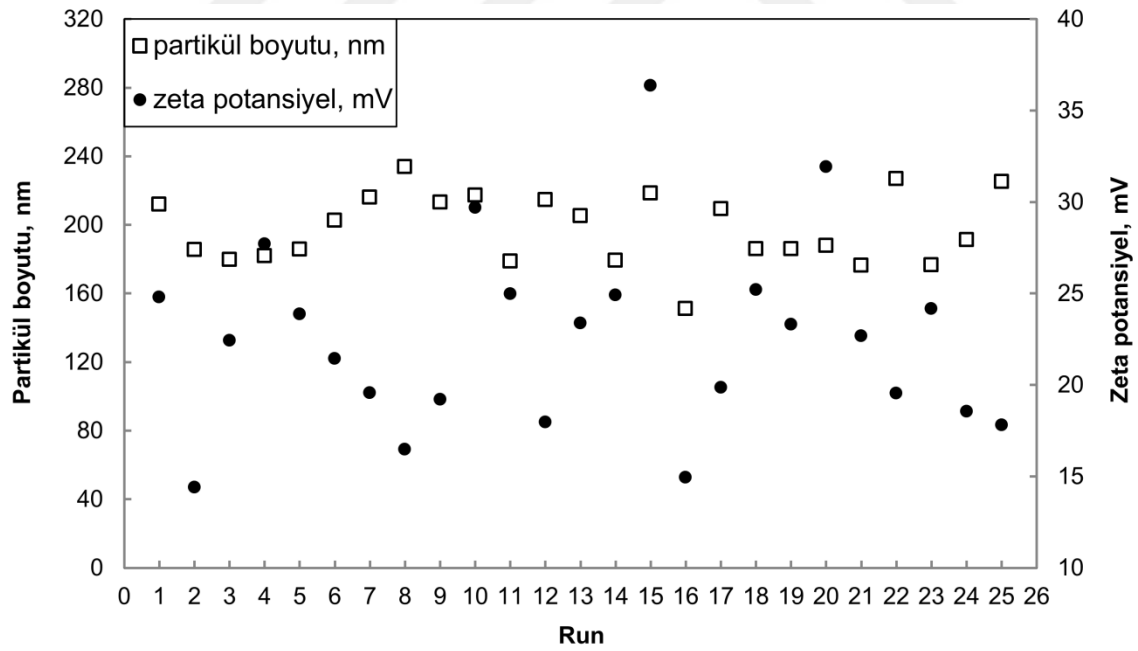
**Çizelge 4.5.** Flaş Nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ve dolgusuz ZNP'nin optimal (custom) deneme deseni izlenerek elde edilen deneysel sonuçlar.

| Run                 | Partikül boyutu (nm) | PDI (%)   | Geçirgenlik (%) | Zeta potansiyeli (mV) | EE (%)     | Ürün verimi (%) |
|---------------------|----------------------|-----------|-----------------|-----------------------|------------|-----------------|
| <b>Dolgusuz ZNP</b> | 147,95±4,73          | 0,11±0,00 | 90              | 30,20±4,38            | -          | -               |
| <b>1</b>            | 211,85±1,34          | 0,11±0,03 | 80±0,00         | 25,10±0,26            | 73,34±3,24 | 71,58           |
| <b>2</b>            | 185,57±2,71          | 0,17±0,04 | 100±0,00        | 14,80±0,36            | 85,26±8,55 | 92,02           |
| <b>3</b>            | 179,64±0,84          | 0,17±0,01 | 70±0,00         | 25,20±3,09            | 72,70±0,06 | 57,02           |
| <b>4</b>            | 181,94±0,99          | 0,18±0,01 | 60±0,00         | 28,40±0,82            | 68,05±2,53 | 69,67           |
| <b>5</b>            | 185,66±1,62          | 0,17±0,08 | 90±0,00         | 19,70±3,97            | 76,22±4,75 | 60,67           |
| <b>6</b>            | 202,53±5,41          | 0,17±0,05 | 70±0,00         | 25,50±4,10            | 72,06±7,48 | 64,98           |
| <b>7</b>            | 216,00±1,06          | 0,17±0,05 | 70±0,00         | 23,80±0,68            | 71,05±0,29 | 66,27           |
| <b>8</b>            | 233,95±2,90          | 0,14±0,05 | 80±0,00         | 19,90±2,21            | 68,43±6,09 | 73,31           |
| <b>9</b>            | 213,10±0,14          | 0,22±0,01 | 50±0,00         | 21,50±2,52            | 78,30±0,40 | 61,88           |
| <b>10</b>           | 217,20±2,69          | 0,16±0,09 | 70±0,00         | 30,10±1,25            | 79,79±1,62 | 75,75           |
| <b>11</b>           | 178,68±2,97          | 0,21±0,01 | 70±0,00         | 25,20±0,21            | 93,54±0,43 | 91,19           |
| <b>12</b>           | 214,65±6,29          | 0,11±0,04 | 76±0,06         | 21,90±3,42            | 64,14±7,94 | 73,37           |
| <b>13</b>           | 205,21±4,35          | 0,18±0,04 | 70±0,00         | 23,90±0,50            | 85,24±0,89 | 54,82           |
| <b>14</b>           | 179,18±1,34          | 0,16±0,02 | 70±0,00         | 30,70±5,06            | 84,25±7,13 | 68,51           |
| <b>15</b>           | 218,40±2,26          | 0,15±0,03 | 70±0,00         | 29,60±5,92            | 71,80±1,47 | 68,49           |
| <b>16</b>           | 151,00±0,25          | 0,14±0,01 | 80±0,00         | 15,40±0,67            | 93,91±2,31 | 74,30           |
| <b>17</b>           | 209,25±0,64          | 0,16±0,05 | 70±0,00         | 21,30±1,99            | 61,01±4,50 | 72,48           |
| <b>18</b>           | 185,90±3,86          | 0,16±0,03 | 90±0,00         | 25,90±0,99            | 80,29±4,01 | 78,10           |
| <b>19</b>           | 185,99±0,29          | 0,16±0,05 | 90±0,00         | 24,50±1,25            | 95,81±0,53 | 36,52           |
| <b>20</b>           | 188,05±0,21          | 0,16±0,01 | 73±0,06         | 32,30±0,32            | 72,78±0,61 | 72,36           |
| <b>21</b>           | 176,38±0,70          | 0,15±0,03 | 90±0,00         | 26,00±2,95            | 78,09±0,49 | 76,59           |
| <b>22</b>           | 226,85±1,48          | 0,15±0,03 | 70±0,00         | 26,50±0,86            | 51,10±0,00 | 60,40           |
| <b>23</b>           | 176,52±2,76          | 0,17±0,03 | 70±0,00         | 23,00±3,12            | 73,72±3,86 | 75,02           |
| <b>24</b>           | 191,38±0,44          | 0,16±0,01 | 90±0,00         | 18,80±0,35            | 81,49±0,55 | 98,90           |
| <b>25</b>           | 225,23±3,02          | 0,18±0,04 | 100±0,00        | 19,80±1,01            | 72,82±6,35 | 78,45           |

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile üretilen zein nanopartiküllerinin deneme desenine göre farklı üretim koşullarında partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri değişimlerinin birlikte incelendiği grafikler sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde, genel olarak zeta potansiyeli değerleri değişkenlik göstererek partikül boyutu değerleri ile anlamlı bir korelasyon göstermemiştir. Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen zein nanopartiküllerin boyut dağılımları 140 nm - 427 nm aralığında ve zeta potansiyeli değerleri -25 mV ve -40 mV aralığında değişim gösterirken; flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen zein nanopartiküllerin boyut dağılımları 151 nm - 233 nm aralığında ve zeta potansiyeli değerleri +15 mV ve +40 mV aralığında gözlenmiştir.



**Şekil 4.1.** Basit nanoçöktürme yöntemi deneme desenine göre üretilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değişim grafiği.



**Şekil 4.2.** Flaş nanoçöktürme yöntemi deneme desenine göre üretilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değişim grafiği.

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile farklı üretim koşullarında üretilen zein nanopartiküllerinin statik *in vitro* sindirim analizi ile ağız ve mide ortamlarındaki SL salınım oranlarının deneysel sonuçları Çizelge 4.6’de verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Statik *in vitro* sindirim analizinde ağız ve mide ortamlarında ZNP’nin sığla yağı salınımları deneysel sonuçları.

| Run | Basit Nanoçöktürme     |                        | Flaş Nanoçöktürme      |                        |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|     | ZNPs ağız              | ZNPs mide              | ZNPs ağız              | ZNPs mide              |
|     | ortamında salınımı (%) | ortamında salınımı (%) | ortamında salınımı (%) | ortamında salınımı (%) |
| 1   | 7,16                   | 51,40                  | 10,32                  | 82,63                  |
| 2   | 8,77                   | 54,08                  | 5,12                   | 44,91                  |
| 3   | 2,99                   | 47,70                  | 13,23                  | 40,47                  |
| 4   | 2,82                   | 50,19                  | 14,87                  | 77,30                  |
| 5   | 26,14                  | 27,64                  | 3,40                   | 80,28                  |
| 6   | 7,18                   | 47,06                  | 13,89                  | 85,42                  |
| 7   | 3,96                   | 44,96                  | 11,02                  | 77,11                  |
| 8   | 4,31                   | 47,25                  | 12,49                  | 75,54                  |
| 9   | 4,57                   | 51,28                  | 15,73                  | 43,43                  |
| 10  | 3,32                   | 44,72                  | 12,81                  | 84,48                  |
| 11  | 3,60                   | 45,80                  | 7,52                   | 36,76                  |
| 12  | *                      | 49,57                  | 12,37                  | 76,75                  |
| 13  | 30,31                  | 28,03                  | 8,24                   | 60,34                  |
| 14  | 5,15                   | 40,83                  | 7,54                   | 50,23                  |
| 15  | 1,99                   | 94,77                  | 6,46                   | 85,52                  |
| 16  | *                      | 50,17                  | 18,21                  | 35,97                  |
| 17  | 1,22                   | 66,31                  | 23,32                  | 90,58                  |
| 18  | 3,16                   | 42,83                  | 6,18                   | 84,78                  |
| 19  | *                      | 66,91                  | 2,65                   | 66,09                  |
| 20  | 22                     | *                      | 14,92                  | 73,58                  |
| 21  | 1,81                   | 54,35                  | 4,66                   | 73,50                  |
| 22  | 9,19                   | 46,57                  | 18,65                  | 86,05                  |
| 23  | 2,46                   | 59,53                  | 15,86                  | 82,91                  |
| 24  | *                      | 28,88                  | 3,63                   | 81,73                  |
| 25  | 3,59                   | 66,74                  | 13,39                  | 49,14                  |

\*Ürün jelleşmesi nedeniyle analiz gerçekleştirilemedi.

Optimizasyon çalışmasında yer alan proses değişkenlerinin her bir yanıt için ilişkisini ifade eden matematiksel model quadratik regresyon analizi seçilerek oluşturulmuştur. Her bir bağımsız değişkenin yanıtlar üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamlılığı F ve p-değerlerinden bulunmuş ve  $p > 0,05$  olan etkiler önemsiz kabul edilmiştir. Regresyon katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş regresyon katsayısı ( $R^2_{adj}$ ) ve varyasyon katsayısı (C.V.) deneysel verilerin modelle uygunluğunun tespit edilmesi için kullanılmıştır. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler ve

değerleri basit nanoçöktürme yöntemi için Çizelge 4.7 ve flaş nanoçöktürme yöntemi için Çizelge 4.8’de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.7.** Basit nanoçöktürme yönteminde modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.

|                    | Partikül boyutu (nm) | PDI (%) | Geçirgenlik (%) | Zeta Potansiyel(mV) | EE (%) | Ağız ortamı salınım | Mide ortamı salınım |
|--------------------|----------------------|---------|-----------------|---------------------|--------|---------------------|---------------------|
| $R^2$              | 0,843                | 0,863   | 0,846           | 0,867               | 0,856  | 0,945               | 0,838               |
| $R^2_{adj}$        | 0,622                | 0,671   | 0,632           | 0,681               | 0,656  | 0,869               | 0,613               |
| C.V. %             | 14,77                | 12,49   | 8,50            | 6,54                | 18,60  | 46,40               | 22,08               |
| Yeterli tahminleme | 8,55                 | 8,78    | 6,80            | 7,19                | 8,21   | 14,96               | 9,70                |

**Çizelge 4.8.** Flaş nanoçöktürme yönteminde modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.

|                    | Partikül boyutu (nm) | PDI (%) | Geçirgenlik (%) | Zeta Potansiyel(mV) | EE (%) | Ağız ortamı salınım | Mide ortamı salınım |
|--------------------|----------------------|---------|-----------------|---------------------|--------|---------------------|---------------------|
| $R^2$              | 0,948                | 0,903   | 0,952           | 0,890               | 0,906  | 0,928               | 0,941               |
| $R^2_{adj}$        | 0,876                | 0,768   | 0,884           | 0,737               | 0,776  | 0,828               | 0,859               |
| C.V. %             | 3,64                 | 7,08    | 4,99            | 9,55                | 6,39   | 20,21               | 9,77                |
| Yeterli tahminleme | 15,23                | 12,37   | 16,65           | 9,47                | 9,88   | 10,72               | 11,03               |

#### 4.3. Sığla Yağı Dolgulu Zein Nanopartikül Üretim Yöntemlerinin ve Proses Değişkenlerinin Etkisi

##### 4.3.1. Partikül Boyutu

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda partikül morfolojisi, boyutu, boyut dağılımı, spesifik yüzey alanı ve zeta potansiyeli nanopartikül özelliklerinin belirlenmesinde incelenen en önemli faktörlerdir. Partiküllerin çapı küçüldükçe artan yüzey alanı ve hücre zarından kolay geçiş gibi üstün özellikler kazanmalarından dolayı, nanopartiküllerin çok düşük nano boyutlarda olmaları tercih edilmektedir. Nanopartikül oluşumu ve boyutu üzerinde, çalışma hacmi, sentezleme yöntemi, polimer oranı, organik solvent faz akış hızı ve karıştırma hızı gibi değişkenler yüksek oranda

etkiliyken, emülgatör varlığının mutlaka gerekli olmadığı bildirilmiştir (Pascoli vd., 2018). Zein nanopartiküllerinin kolloidal stabilitesini güçlendirmek amacıyla zein ile kombine edilen polisakkarit (Yang vd., 2022); pektin (Thankappan vd., 2020); reçine (Ragic vd., 2021); PEG-b-PLA (Ye vd., 2022) ve kitosan (Loureiro vd., 2022) gibi materyallerin kullanıldığı görülmektedir. Öte yandan, oluşan nanopartikülleri aggregasyondan korumak için su fazı içine pluronik/poloksamer (yüzey aktif madde içeren) stabilizatörler, lesitin, Tween 80, PVA, sodyum kazeinat ve kitosan gibi polimer destekleyici malzemeler ilave edilmektedir (Badri vd., 2018; Noronha vd., 2013; Popiolski vd., 2016; Podaralla ve Perumal, 2010; Rosa vd., 2015). Tez çalışması kapsamında basit nanoçöktürme yöntemi ile sıgla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretimi zein ile kombine herhangi bir destekleyici materyal veya su fazı içinde herhangi bir stabilizatör kullanmaksızın gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin boyutları, dinamik ışık saçılımı prensibiyle ölçülen kolloidal çözelti içindeki hidrodinamik çaplarını ifade etmektedir.

Basit nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin (SL-ZNP) partikül boyutları 140,31 ve 427,40 nm arasında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz ZNP boyutu ise 112,40 nm olarak tespit edilmiştir. Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen nanopartiküllerin boyutu, zein konsantrasyonundan istatistiksel olarak önemli ( $p < 0,05$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin partikül boyutu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Partikül Boyutu (nm) |          |          |
|--------------------------------|-----------|----------------------|----------|----------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 76044,23             | 3,82     | 0,0194*  |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 9251,98              | 6,51     | 0,0287*  |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1         | 80,11                | 0,0564   | 0,8171   |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 567,46               | 0,3996   | 0,5415   |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 189,60               | 0,1335   | 0,7224   |
| AB                             | 1         | 16827,53             | 11,85    | 0,0063** |
| AC                             | 1         | 5225,25              | 3,68     | 0,0841   |
| AD                             | 1         | 13084,87             | 9,21     | 0,0126*  |
| BC                             | 1         | 1709,56              | 1,20     | 0,2983   |
| BD                             | 1         | 179,37               | 0,1263   | 0,7297   |
| CD                             | 1         | 17083,97             | 12,03    | 0,0060** |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 3394,51              | 2,39     | 0,1531   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 1313,70              | 0,9251   | 0,3588   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 2954,07              | 2,08     | 0,1798   |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 252,40               | 0,1777   | 0,6822   |
| Kalıntı                        | 10        | 14201,16             |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 7610,67              | 1,15     | 0,4392   |
| Saf hata                       | 5         | 6590,50              |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>90245,40</b>      |          |          |

\*p<0,05 ve \*\* p<0,01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile farklı proses koşullarında elde edilen sığla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin (ZNP) partikül boyutları 151,00 ve 233,95 nm arasında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz ZNP boyutu ise 147,95 nm olarak tespit edilmiştir. Flaş nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin boyutu, zein konsantrasyonu ve çözelti karıştırma hızından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.10).

**Çizelge 4.10.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin partikül boyutu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

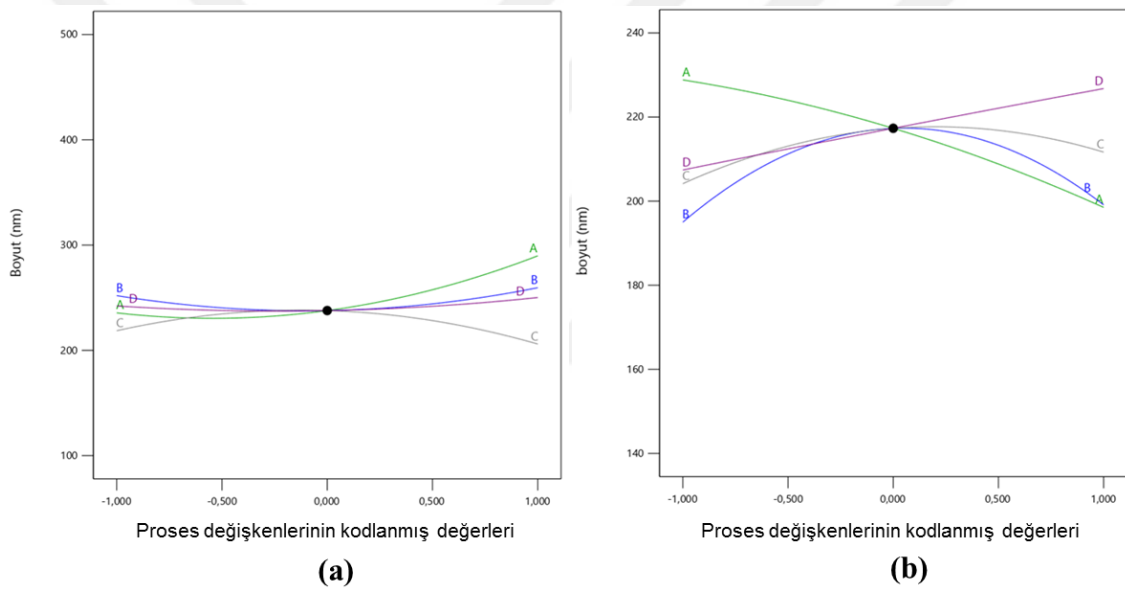
| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Partikül Boyutu (nm) |          |            |
|--------------------------------|-----------|----------------------|----------|------------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 9552,29              | 13,19    | 0,0001**   |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 2282,59              | 44,12    | < 0.0001** |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1         | 41,70                | 0,8060   | 0,3904     |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 142,24               | 2,75     | 0,1283     |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 1029,69              | 19,90    | 0,0012**   |
| AB                             | 1         | 1278,85              | 24,72    | 0,0006**   |
| AC                             | 1         | 33,10                | 0,6397   | 0,4424     |
| AD                             | 1         | 119,76               | 2,31     | 0,1591     |
| BC                             | 1         | 4,79                 | 0,0926   | 0,7672     |
| BD                             | 1         | 71,85                | 1,39     | 0,2659     |
| CD                             | 1         | 35,00                | 0,6765   | 0,4300     |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 66,27                | 1,28     | 0,2841     |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 1781,82              | 34,44    | 0,0002**   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 305,59               | 5,91     | 0,0354     |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 0,2043               | 0,0039   | 0,9511     |
| Kalıntı                        | 10        | 517,35               |          |            |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 318,32               | 1,60     | 0,3095     |
| Saf hata                       | 5         | 199,04               |          |            |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>10069,64</b>      |          |            |

\*p<0,05 ve \*\* p<0,01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Proses değişkenlerinin, nanopartiküllerin partikül boyutu üzerine etkileri Şekil 4.3'de yer alan pertürbasyon grafikleri kullanılarak elde edilen model üzerinden incelenmiştir. Basit nanoçöktürme yönteminde, çekirdeklenme ve stabilizasyon aşamaları aynı çözelti hacmi içinde gerçekleşmiştir. Bu yöntemde zein konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak partikül boyutunun arttığı buna karşılık sığla yağı oranının artmasıyla partikül boyutunun artmadığı görülmüştür. Bu durum, sığla yağının içeriğinde saflaştırılamayla kısmen ayrılmayan reçine benzeri moleküllerin nanopartikül koagülasyonunu önleyici ve zein polimerini destekleyici bir çeşit stabilizatör gibi davranması ile ilişkili olabilir (Rajic vd., 2021; Rosa vd., 2015). Organik faz akış hızının artmasıyla partikül boyutunun bir miktar düştüğü görülmektedir. Bu durum solvent faz ve antisolvent faz arayüzeyinde gerçekleşen ve nanopartikül oluşumunun ilk ve en önemli aşaması olan çekirdeklenme aşamasının hızlı bir şekilde gerçekleşmesi ve karıştırma yardımıyla stabilize olması ile ilişkilidir.

Flaş nanoçöktürme yönteminde, çekirdeklenme ve stabilizasyon aşamaları birbirlerinden ayrı çözelti hacmi içinde gerçekleşmiştir. Bu yöntemde zein konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunun küçüldüğü görülmektedir. Öte yandan,

düşük sıgla yağı oranında partikül boyutunun küçük olduğu, oranın artmasıyla bir miktar arttığı ve yüksek sıgla yağı oranında partikül boyutunun tekrar küçüldüğü görülmektedir. Bu durum, stabilizatör olarak kullanılan kitosanın ve sıgla yağının içeriğindeki moleküllerin bağımsız olarak nanopartikül koagülasyonunu önleyici ve zein polimerini destekleyici şekilde davranması ile ilişkili olabilir (Rajic vd., 2021; Rosa vd., 2015). Flaş nanoçöktürme yönteminde, organik solvent faz akış hızı ve karıştırma hızı arttıkça partikül boyutunun arttığı görülmektedir. Bu durum, stabilizasyon aşamasında karıştırma hızının artmasıyla nanopartiküllerin birbirleriyle olan etkileşimlerini arttırmasından kaynaklanmış olabilir.



**Şekil 4.3.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

Bu sonuçlara göre tez çalışması kapsamında, yalnız zein kullanılarak basit nanoçöktürme yöntemi ile stabilizatörsüz ve flaş nanoçöktürme yöntemi ile stabilizatör olarak kitosan kullanılarak kararlı sıgla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Genel olarak her iki yöntem ile elde edilen nanopartiküller partikül boyutu açısından karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar minimum partikül boyutunun sağlandığı flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilmiştir.

#### 4.3.2. Polidispersite İndeksi

Polidispersite indeksi (PDI) partikül formuna, dağılımına ve homojenliğine ilişkin bilgi veren önemli bir parametredir.  $PDI < 0,1$  çok dar boyut dağılımlı,  $PDI < 0,2$  neredeyse hiç kesintiye uğramamış dar boyut dağılımlı ve  $PDI < 0,3$  genel olarak agregasyon olmaksızın homojen ve dar boyut dağılımlı (monodispers) nanopartiküllerin olduğu kolloidal sistemleri ifade etmektedir (Melo vd., 2019; Xing vd., 2022).

Basit nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen sıgla yağı dolgulu nanopartiküllerinin polidispersite indeksi (PDI) %0,08 ve %0,27 aralığında dar bir boyut dağılıma sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu yöntemle üretilen sıgla yağı dolgusuz ZNP'nin polidispersite indeksi (PDI) ise %0,15 olarak tespit edilmiştir. Basit nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin polidispersite indeksi (PDI), organik solvet faz akış hızından istatistiksel olarak önemli ( $p < 0,05$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.11).

**Çizelge 4.11.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin polidispersite indeksi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Polidispersite indeksi (%) |          |          |
|--------------------------------|-----------|----------------------------|----------|----------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı       | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 0,0375                     | 4,50     | 0,0108*  |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 0,0001                     | 0,0965   | 0,7624   |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1         | 0,0003                     | 0,5147   | 0,4895   |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 0,0033                     | 5,60     | 0,0394*  |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 0,0005                     | 0,7688   | 0,4012   |
| AB                             | 1         | 0,0034                     | 5,64     | 0,0389*  |
| AC                             | 1         | 0,0070                     | 11,80    | 0,0064** |
| AD                             | 1         | 4,951E-06                  | 0,0083   | 0,9291   |
| BC                             | 1         | 0,0007                     | 1,14     | 0,3107   |
| BD                             | 1         | 0,0028                     | 4,63     | 0,0568   |
| CD                             | 1         | 0,0051                     | 8,56     | 0,0152*  |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0000                     | 0,0508   | 0,8262   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0018                     | 3,11     | 0,1083   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0008                     | 1,42     | 0,2608   |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0121                     | 20,41    | 0,0011** |
| Kalıntı                        | 10        | 0,0059                     |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 0,0013                     | 0,2721   | 0,9102   |
| Saf hata                       | 5         | 0,0047                     |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>0,0434</b>              |          |          |

\* $p < 0,05$  ve \*\*  $p < 0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile farklı proses koşullarında elde edilen sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin (ZNP) polidispersite endeksi (PDI) %0,11 ve %0,22 aralığında dar bir boyut dağılıma sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz ZNP'nin polidispersite endeksi (PDI) ise %0,11 olarak tespit edilmiştir. Flaş nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin polidispersite endeksi (PDI), sıgla yağı oranı, organik solvent faz akış hızı ve çözelti karıştırma hızından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.12).

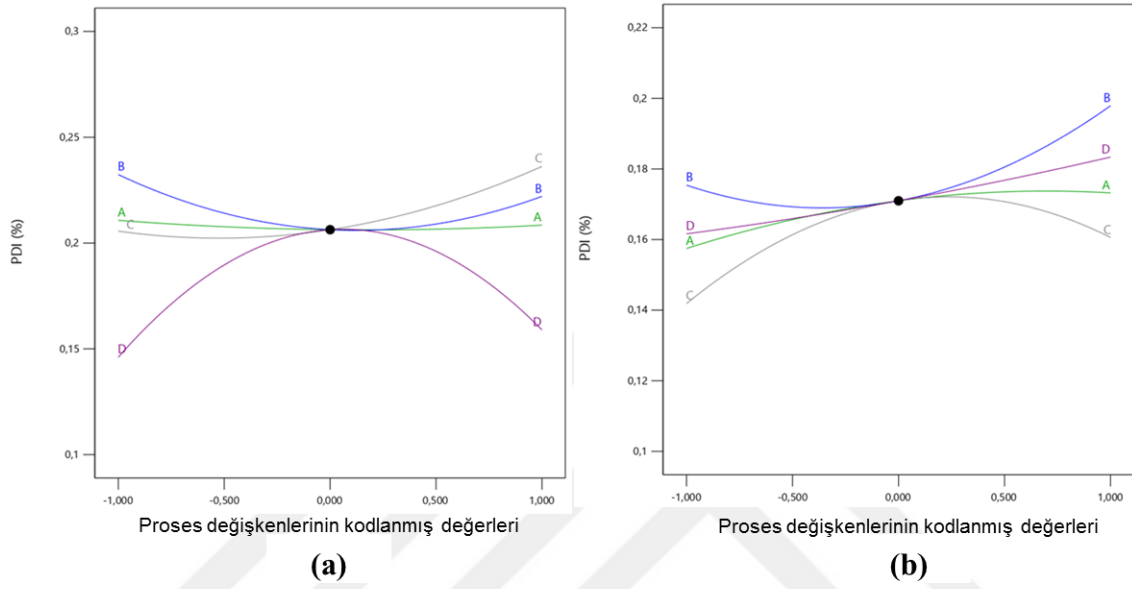
**Çizelge 4.12.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin polidispersite indeksi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Polidispersite indeksi (%) |          |          |
|--------------------------------|-----------|----------------------------|----------|----------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı       | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 0,0123                     | 6,70     | 0,0023** |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 0,0006                     | 4,69     | 0,0556   |
| B- Sıgla yağı oranı (%)        | 1         | 0,0012                     | 9,46     | 0,0117*  |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 0,0009                     | 6,75     | 0,0266*  |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 0,0013                     | 9,89     | 0,0104*  |
| AB                             | 1         | 0,0000                     | 0,2959   | 0,5984   |
| AC                             | 1         | 0,0037                     | 28,46    | 0,0003** |
| AD                             | 1         | 0,0010                     | 7,65     | 0,0199*  |
| BC                             | 1         | 1,193E-06                  | 0,0091   | 0,9259   |
| BD                             | 1         | 0,0005                     | 3,74     | 0,0819   |
| CD                             | 1         | 0,0004                     | 2,73     | 0,1298   |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0002                     | 1,21     | 0,2972   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0011                     | 8,10     | 0,0173*  |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 0,0013                     | 10,27    | 0,0094** |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 8,835E-06                  | 0,0673   | 0,8006   |
| Kalıntı                        | 10        | 0,0013                     |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 0,0008                     | 1,80     | 0,2664   |
| Saf hata                       | 5         | 0,0005                     |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>0,0136</b>              |          |          |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Basit ve Flaş nanoçöktürme yöntemleriyle elde edilen nanopartiküllerin PDI değeri üzerine proses değişkenlerinin etkileri Şekil 4.4'de yer alan modellere ait pertürbasyon grafiklerinde detaylı görülmektedir. Basit nanoçöktürme yönteminde, sıgla yağı oranının artmasıyla PDI değeri azalmış yüksek sıgla yağı oranlarında bir miktar artmıştır. Organik solvent fazın akış hızı arttıkça PDI değerleri yükselmiştir. Bu durum partiküllerin hızlı bir şekilde oluşmasının ardından dağılımların dar bir aralıkta tutmanın kontrol edilememesinden kaynaklanmış olabilir. Karıştırma hızı arttıkça PDI değerleri artmış ve bir noktadan sonra azalmıştır. Karıştırma ile kolloidal partiküllerin

etkileşimlerinin artması homojenliği azaltan koagülasyonlara neden olmuş ve belirli bir karıştırma hızı üzerinde ise tekrar partikülleri dispers etmiş olabilir. Flaş nanoçöktürme yönteminde ise, nanopartiküllerin PDI değerlerinin proses değişkenleri ile pozitif yönlü ilişkili olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.4.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sığla yağı dolgulu ZNP'nin polidispersite indeksi (%) üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

Bu sonuçlara göre tez çalışması kapsamında, basit nanoçöktürme ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile dar boyut dağılımına sahip sığla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Genel olarak her iki yöntem ile elde edilen nanopartiküller PDI açısından karşılaştırıldığında iki yöntemde de benzer PDI değerlerinin elde edildiği görülmüştür.

#### 4.3.3. Geçirgenlik (Transmittans) Değeri

Geçirgenlik (transmittans) değeri ışığın emilmesi/yansıtılması ile ilişkilidir ve şeffaf olmayan bir malzeme ışığı emebilir ve/veya yansıtabilir. Nanopartikül içeren kolloidal çözeltiler UV ve görünür bölgede düşük ışık geçirgenliği sergiler (Rosa vd.,

2020). Elde edilen nanopartiküllerin optik karakterizasyonunun belirlenmesi için geçirgenlik değerleri ölçülmüştür.

Basit nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen sıgla yağı dolgulu nanopartiküllerinin geçirgenlik (transmittans) değerleri %60 - %100 aralığında tespit edilmiştir. Bu yöntemle üretilen sıgla yağı dolgusuz ZNP geçirgenlik (transmittans) değerleri ise %100 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen modelde, basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen nanopartiküllerin geçirgenlik (transmittans) değerleri, sıgla yağı oranından ve çözelti karıştırma hızından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.13). Basit nanoçöktürme yönteminde proses değişkenlerinin partiküllerin geçirgenlik değerleri üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiğinde (Şekil 4.6) sıgla yağı oranı ve karıştırma hızı arttıkça geçirgenlik değerleri düşmektedir. Sıgla yağı oranı artışıyla geçirgenlik değerinde gözlenen düşüş kaplanmayan sıgla yağının kolloidal partikül çözeltisinde optik geçirgenliği düşürücü etki yapmasından kaynaklı olabilir. Öte yandan karıştırma hızı artışı nanopartikül etkileşimlerini arttırıcı etki yaparak koagülasyonu tetiklemiş ve çözeltinin geçirgenlik değerini düşürmüş olabilir.

**Çizelge 4.13.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin geçirgenlik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Geçirgenlik (%)      |          |          |
|--------------------------------|-----------|----------------------|----------|----------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 3261,77              | 3,95     | 0,0174*  |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 32,25                | 0,5463   | 0,4768   |
| B- Sıgla yağı oranı (%)        | 1         | 448,00               | 7,59     | 0,0203*  |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 0,4719               | 0,0080   | 0,9305   |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 335,31               | 5,68     | 0,0384*  |
| AB                             | 1         | 172,84               | 2,93     | 0,1179   |
| AC                             | 1         | 408,70               | 6,92     | 0,0251*  |
| AD                             | 1         | 779,71               | 13,21    | 0,0046** |
| BC                             | 1         | 93,51                | 1,58     | 0,2368   |
| BD                             | 1         | 19,30                | 0,3269   | 0,5801   |
| CD                             | 1         | 79,14                | 1,34     | 0,2738   |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 115,28               | 1,95     | 0,1925   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 1,63                 | 0,0277   | 0,8712   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 1460,78              | 24,74    | 0,0006** |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 16,00                | 0,2710   | 0,6140   |
| Kalıntı                        | 10        | 590,39               |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 340,39               | 1,36     | 0,3716   |
| Saf hata                       | 5         | 250,00               |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>3852,16</b>       |          |          |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

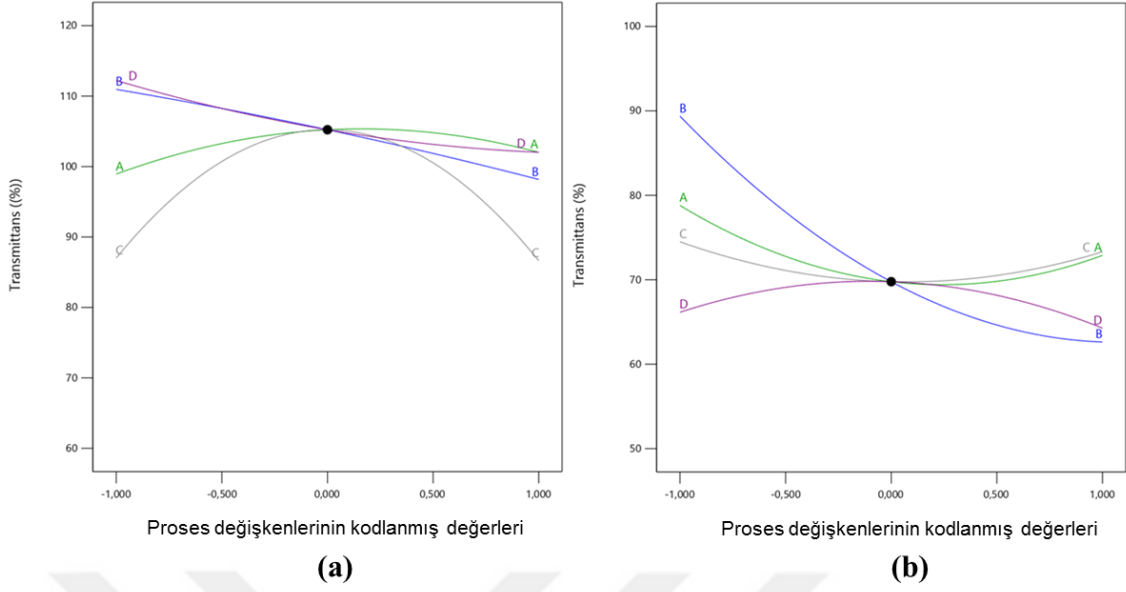
Flaş nanoçöktürme yöntemi ile farklı proses koşullarında elde edilen sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin (ZNP) geçirgenlik (transmittans) değerleri %50 - %100 arasında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz ZNP geçirgenlik değeri ise %90 olarak tespit edilmiştir. Flaş nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin geçirgenlik değerleri, zein konsantrasyonundan ( $p<0,05$ ) ve sıgla yağı oranından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.14). Nanopartiküllerin geçirgenlik değeri üzerine proses değişkenlerinin etkileri pertürbasyon grafiğinden incelendiğinde zein konsantrasyonu ve sıgla yağı oranı arttıkça geçirgenlik değerleri düşmektedir (Şekil 4.5). Bununla birlikte organik solvent faz akış hızı ve karıştırma hızının geçirgenlik değerlerini önemli ölçüde etkilemediği görülmektedir.

**Çizelge 4.14.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin geçirgenlik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Geçirgenlik (%)      |          |            |
|--------------------------------|-----------|----------------------|----------|------------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 2840,11              | 14,16    | < 0.0001** |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 86,83                | 6,06     | 0,0336*    |
| B- Sıgla yağı oranı (%)        | 1         | 1756,01              | 122,59   | < 0.0001** |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 3,57                 | 0,2492   | 0,6284     |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 9,65                 | 0,6737   | 0,4309     |
| AB                             | 1         | 110,67               | 7,73     | 0,0195*    |
| AC                             | 1         | 21,13                | 1,48     | 0,2524     |
| AD                             | 1         | 16,64                | 1,16     | 0,3065     |
| BC                             | 1         | 1,16                 | 0,0810   | 0,7817     |
| BD                             | 1         | 89,81                | 6,27     | 0,0312*    |
| CD                             | 1         | 12,47                | 0,8708   | 0,3727     |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 184,01               | 12,85    | 0,0050**   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 168,51               | 11,76    | 0,0064**   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 58,95                | 4,12     | 0,0700     |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 80,93                | 5,65     | 0,0388*    |
| Kalıntı                        | 10        | 143,25               |          |            |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 93,25                | 1,86     | 0,2553     |
| Saf hata                       | 5         | 50,00                |          |            |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>2983,36</b>       |          |            |

\* $p<0,05$  ve \*\* $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Genel olarak her iki yöntemde de partiküllerin geçirgenlik değeri üzerine sıgla yağı oranının önemli ölçüde etki ettiği görülmektedir.



**Şekil 4.5.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin geçirgenlik (%) değerleri üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

#### 4.3.4. Zeta Potansiyeli ( $\zeta$ )

Nanopartiküllerin stabiliteleri hakkında detaylı bilgi veren zeta potansiyel değeri partikül yüzeyindeki elektriksel çift tabakadaki elektrostatik potansiyel olarak tanımlanır (Melo vd., 2019). Zeta potansiyel değeri  $\pm 30$  mV aralığında yüklü (negatif veya pozitif) partiküllerin elektrostatik itme kuvvetleri nedeniyle kolloidal dispersiyonda fiziksel olarak stabil dispersiyon sağladığı kabul edilir.  $+30$  mV'dan düşük ve  $-30$  mV'dan yüksek,  $0$  mV'a yakın zeta potansiyeli değerlerine sahip nanopartiküller agregasyon veya koagülasyona eğilimli ve kararsızdır. Zeta potansiyelinin pozitif veya negatif değer alması, taşıyıcı polimerin kimyasal yapısına ve stabilize edici materyalin türüne bağlıdır (Rosa, 2015). Hidrofilik bileşenler içeren taşıyıcı polimerler sıfır olmayan zeta potansiyeli sergiliyorsa genellikle stabilizatör kullanmak gerekli değildir (Lepeltier vd., 2014).

Basit nanoçöktürme yöntemi ile sıgla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri  $-26.15$  mV ve  $-39.60$  mV aralığında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz ZNP'nin zeta potansiyel değeri ise  $-27,05$  mV olarak tespit edilmiştir.

Bu yöntemde, stabilizatör kullanılmadan üretilen zein nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinin negatif ölçülmesi, zein polimerinin negatif yüzey yüküne sahip olması ve sıgla yağı dolgusunun yüzey yük değerine önemli ölçüde etki etmemiş olmasından kaynaklıdır (Podaralla ve Perumal, 2010). Basit nanoçöktürme ile üretilen zein nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri, sıgla yağı oranından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.15).

**Çizelge 4.15.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin zeta potansiyeli üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD | Zeta potansiyeli (mV) |          |            |
|--------------------------------|----|-----------------------|----------|------------|
|                                |    | Hata Kareler Toplamı  | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14 | 346,82                | 4,66     | 0,0095**   |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1  | 0,0793                | 0,0149   | 0,9052     |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1  | 271,57                | 51,11    | < 0,0001** |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1  | 3,31                  | 0,6234   | 0,4481     |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1  | 4,79                  | 0,9020   | 0,3646     |
| AB                             | 1  | 0,0009                | 0,0002   | 0,9899     |
| AC                             | 1  | 9,95                  | 1,87     | 0,2012     |
| AD                             | 1  | 5,67                  | 1,07     | 0,3258     |
| BC                             | 1  | 0,2832                | 0,0533   | 0,8221     |
| BD                             | 1  | 1,77                  | 0,3339   | 0,5761     |
| CD                             | 1  | 3,78                  | 0,7112   | 0,4188     |
| A <sup>2</sup>                 | 1  | 1,02                  | 0,1916   | 0,6709     |
| B <sup>2</sup>                 | 1  | 28,42                 | 5,35     | 0,0433*    |
| C <sup>2</sup>                 | 1  | 14,28                 | 2,69     | 0,1321     |
| D <sup>2</sup>                 | 1  | 2,54                  | 0,4783   | 0,5049     |
| Kalıntı                        | 10 | 53,13                 |          |            |
| Model uygunsuzluğu             | 5  | 27,85                 | 1,10     | 0,4591     |
| Saf hata                       | 5  | 25,29                 |          |            |
| <b>Toplam</b>                  | 24 | 399,96                |          |            |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile farklı proses koşullarında elde edilen sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin (ZNP) zeta potansiyel değerleri +14,80 mV ve +32,30 mV arasında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz ZNP'nin zeta potansiyel değeri ise +32,95 mV olarak tespit edilmiştir. Bu yöntemle üretilen partiküllerin zeta potansiyel değerleri, stabilizatör olarak kullanılan kitosanın zein partikül çevresindeki yük dağılımına etki etmesinden kaynaklı olarak pozitif değer almıştır. Flaş nanoçöktürme ile üretilen zein nanopartiküllerinin zeta potansiyel

değerleri, zein konsantrasyonundan ve çözelti karıştırma hızından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.16).

**Çizelge 4.16.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin zeta potansiyeli üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

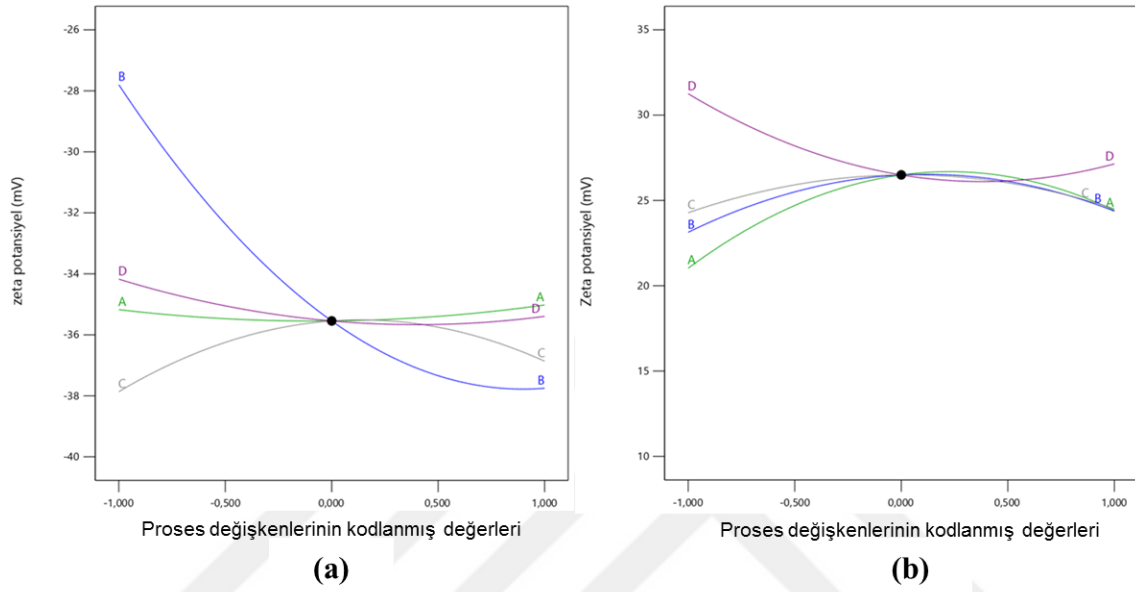
| Varyasyon Kaynağı              | SD | Zeta potansiyeli (mV) |          |          |
|--------------------------------|----|-----------------------|----------|----------|
|                                |    | Hata Kareler Toplamı  | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14 | 427,31                | 5,83     | 0,0041*  |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1  | 28,58                 | 5,46     | 0,0416*  |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1  | 3,77                  | 0,7198   | 0,4160   |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1  | 0,1342                | 0,0256   | 0,8760   |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1  | 46,41                 | 8,86     | 0,0139*  |
| AB                             | 1  | 81,36                 | 15,53    | 0,0028** |
| AC                             | 1  | 4,52                  | 0,8631   | 0,3747   |
| AD                             | 1  | 2,04                  | 0,3899   | 0,5463   |
| BC                             | 1  | 27,82                 | 5,31     | 0,0439*  |
| BD                             | 1  | 24,41                 | 4,66     | 0,0562   |
| CD                             | 1  | 0,5423                | 0,1035   | 0,7542   |
| A <sup>2</sup>                 | 1  | 70,95                 | 13,55    | 0,0042** |
| B <sup>2</sup>                 | 1  | 32,64                 | 6,23     | 0,0316   |
| C <sup>2</sup>                 | 1  | 15,23                 | 2,91     | 0,1189   |
| D <sup>2</sup>                 | 1  | 28,46                 | 5,43     | 0,0420*  |
| Kalıntı                        | 10 | 52,38                 |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5  | 15,76                 | 0,4303   | 0,8119   |
| Saf hata                       | 5  | 36,62                 |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | 24 | 479,68                |          |          |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak zeta potansiyelindeki değişim Şekil 4.6'da pertürbasyon grafiklerinde gösterilmiştir. Basit nanoçöktürme yönteminde, sığla yağı oranı arttıkça zeta potansiyel değerlerinde mutlak değerce artış gözlenmiştir. Bu yöntemde sığla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin, dolgusuz zein nanopartikülüne göre mutlak değerce daha yüksek zeta potansiyel değerlerine sahip olması, sığla yağının çözeltide zein nanopartiküllerinin kolloidal stabilitelerini arttırıcı yönde davrandığını göstermektedir. Sığla yağı oranı minimize edildiğinde zein konsantrasyonu, organik faz akış hızı ve çözelti karıştırma hızının etkisi önemsizdir.

Flaş nanoçöktürme yönteminde sığla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin, dolgusuz zein nanopartikülüne göre mutlak değerce daha düşük zeta potansiyel değerlerine sahip olması, sığla yağının çözeltide zein nanopartiküllerinin kolloidal stabilitelerini azaltıcı yönde davrandığını göstermektedir. Flaş nanoçöktürme yönteminde, zein konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyel değerleri mutlak değerce

artmış, çözelti karıştırma hızı arttıkça zeta potansiyel değerleri mutlak değerce azalmıştır. Bu sonuca göre, flaş nanoçöktürme yönteminde jet akış sayesinde hızlı bir şekilde oluşan nanopartiküllerin, karıştırma altında stabilize olurken yüksek karıştırma hızında partiküllerin yük dağılımlarına negatif yönlü etki ettiği öngörülebilir.



**Şekil 4.6.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulı ZNP'nin zeta potansiyeli (mV) üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

#### 4.3.5. Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde doğrudan etkili bir parametredir. Enkapsülasyon etkinliği, taşıyıcı polimer içine hapsedilen aktif bileşen miktarının, kullanılan toplam aktif bileşen miktarına oranıdır (Macias-Cortes vd., 2020). Enkapsülasyon etkinliği, nanopartikül sentezleme yöntemi, taşıyıcı polimer malzeme ve aktif bileşen özellikleri gibi birçok parametreye bağlıdır (Melo vd., 2019). Taşıyıcı polimeri destekleyici materyallerle oluşturulan hibrit nanopartiküller proses ve depolama süresince daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahiptir (Martinez-Munoz vd., 2020).

Basit nanoçöktürme yöntemi ile sıgla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri %23,87 ve %75,87 aralığında tespit edilmiştir. Basit nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri, zein konsantrasyonundan ve sıgla yağı oranından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.17). Enkapsülasyon etkinliği üzerine etki eden en önemli faktörler zein konsantrasyonu ve sıgla yağı oranıdır. Zein konsantrasyonunun artması enkapsülasyon etkinliğini artırırken sıgla yağı oranının artması enkapsülasyon etkinliğini azaltmıştır.

**Çizelge 4.17.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin enkapsülasyon etkinliği üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | Enkapsülasyon Etkinliği (%) |          |          |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------|----------|----------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı        | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 4923,79                     | 4,27     | 0,0131*  |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 872,19                      | 10,59    | 0,0087** |
| B- Sıgla yağı oranı (%)        | 1         | 2912,52                     | 35,36    | 0,0001** |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 6,03                        | 0,0732   | 0,7922   |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 83,44                       | 1,01     | 0,3379   |
| AB                             | 1         | 9,95                        | 0,1208   | 0,7353   |
| AC                             | 1         | 49,77                       | 0,6043   | 0,4549   |
| AD                             | 1         | 124,00                      | 1,51     | 0,2479   |
| BC                             | 1         | 14,12                       | 0,1715   | 0,6875   |
| BD                             | 1         | 4,55                        | 0,0552   | 0,8189   |
| CD                             | 1         | 35,54                       | 0,4315   | 0,5261   |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 77,48                       | 0,9408   | 0,3549   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 224,84                      | 2,73     | 0,1295   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 77,53                       | 0,9414   | 0,3548   |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 417,81                      | 5,07     | 0,0480*  |
| Kalıntı                        | 10        | 823,58                      |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 559,01                      | 2,11     | 0,2156   |
| Saf hata                       | 5         | 264,57                      |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>5747,37</b>              |          |          |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile sıgla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri %51,10 ve %95,81 aralığında tespit edilmiştir. Flaş nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri, zein konsantrasyonundan ( $p<0,01$ ) ve sıgla yağı oranından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilenmektedir

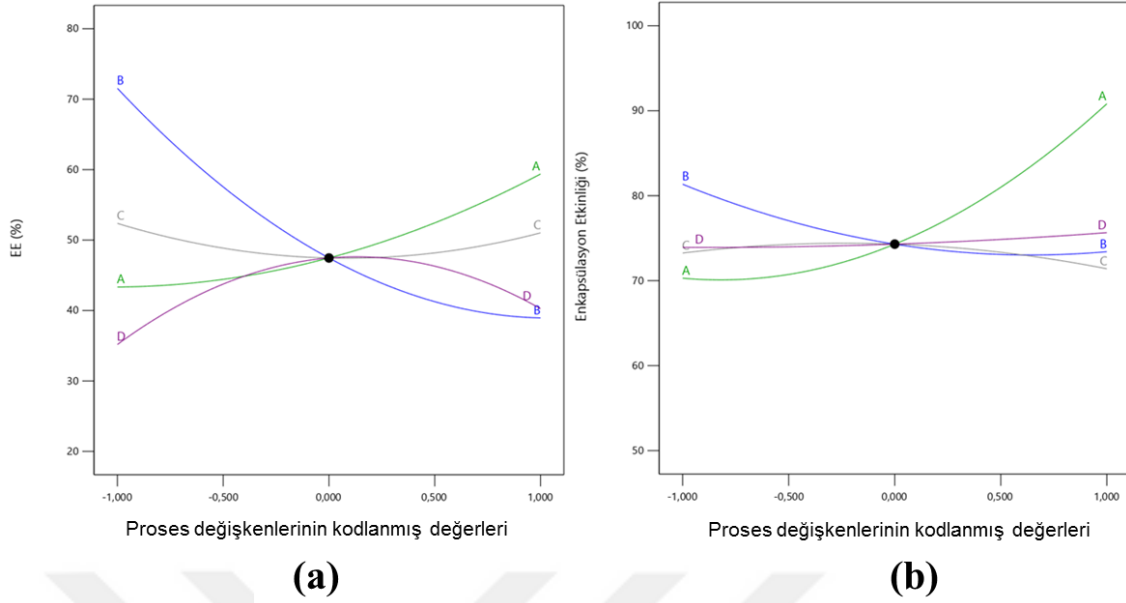
(Çizelge 4.18). Enkapsülasyon etkinliği zein konsantrasyonu ile pozitif yönlü korelasyon gösterirken sıgla yağı oranıyla negatif yönlü korelasyon göstermiştir.

**Çizelge 4.18.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin enkapsülasyon etkinliği üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı                     | SD | Enkapsülasyon Etkinliği (%) |          |            |
|---------------------------------------|----|-----------------------------|----------|------------|
|                                       |    | Hata Kareler<br>Toplamı     | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>               | 14 | 2302,22                     | 6,94     | 0,0020**   |
| <b>A-</b> Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1  | 1046,29                     | 44,16    | < 0,0001** |
| <b>B-</b> Sıgla yağı oranı (%)        | 1  | 154,76                      | 6,53     | 0,0286*    |
| <b>C-</b> Akış hızı (ml/dk)           | 1  | 8,65                        | 0,3651   | 0,5592     |
| <b>D-</b> Karıştırma hızı (rpm)       | 1  | 8,24                        | 0,3477   | 0,5685     |
| <b>AB</b>                             | 1  | 234,75                      | 9,91     | 0,0104     |
| <b>AC</b>                             | 1  | 2,27                        | 0,0956   | 0,7635     |
| <b>AD</b>                             | 1  | 1,23                        | 0,0518   | 0,8246     |
| <b>BC</b>                             | 1  | 8,77                        | 0,3701   | 0,5565     |
| <b>BD</b>                             | 1  | 28,89                       | 1,22     | 0,2953     |
| <b>CD</b>                             | 1  | 76,27                       | 3,22     | 0,1030     |
| <b>A<sup>2</sup></b>                  | 1  | 195,36                      | 8,25     | 0,0166     |
| <b>B<sup>2</sup></b>                  | 1  | 41,30                       | 1,74     | 0,2162     |
| <b>C<sup>2</sup></b>                  | 1  | 13,45                       | 0,5677   | 0,4685     |
| <b>D<sup>2</sup></b>                  | 1  | 0,9132                      | 0,0385   | 0,8483     |
| <b>Kalıntı</b>                        | 10 | 236,91                      |          |            |
| <b>Model uygunsuzluğu</b>             | 5  | 161,41                      | 2,14     | 0,2120     |
| <b>Saf hata</b>                       | 5  | 75,50                       |          |            |
| <b>Toplam</b>                         | 24 | 2539,13                     |          |            |

\*p<0,05 ve \*\* p<0,01 seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerindeki değişim Şekil 4.7'de pertürbasyon grafiklerinde gösterilmiştir. Her iki nanoçöktürme yönteminde de, zein konsantrasyonu arttıkça ve sıgla yağı oranı azaldıkça nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği artmaktadır. Diğer proses değişkenlerinden organik solvent faz akış hızı ve karıştırma hızının etkisi önemsizdir.



**Şekil 4.7.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulu ZNP'nin enkapsülasyon etkinliği üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

#### 4.3.6. *In Vitro* Sindirim Analizi

Sindirim süreçlerini simüle eden *in vitro* yöntemler, gıda ve ilaçların gastrointestinal davranışlarını incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Statik sindirim modelleri, sindirilebilirlik, biyosindirim ve biyoemilim gibi bilimsel soruları ele alan ve tipik olarak ağız, mide, ince bağırsak ve fermentasyon içeren kalın bağırsak aşamalarını içerir (Minekus vd., 2014). Gıda biyoaktif bileşenlerinin nanokapsül formunda vücuda alındığında, sindirim süreçlerinden korunması, hücre içi alımlarının hızlanması, biyoyararlanımlarının artması, gastrointestinal sistem ataklarından korunarak vücut içi alımlarının iyileşmesi ve hedef bölgelere taşınımlarının kolaylaşması beklenmektedir (Nayak vd., 2016; Shishir vd., 2018). Tez çalışması kapsamında, basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleriyle üretilen sıgla yağı dolgulu zein ve PCL nanopartiküllerinin *in vitro* ağız ortamında minimum seviyede açılması sağlanarak sıgla yağının oral tüketimini zorlaştıran acı(bitter) tadının ve petrolümsü kokusunun baskılanması hedeflenmiştir.

#### 4.3.6.1. *In Vitro* Ağız Sindirim Ortamı Sığıla Yağı Salınımı

Basit nanoçöktürme yöntemi ile sığıla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları %1,22 ve %30,31 aralığında tespit edilmiştir. Basit nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları, tüm proses değişkenlerinden istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu yöntemde, nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınım oranları zein konsantrasyonundan ( $p<0,05$ ), sığıla yağı oranından, organik faz akış hızı ve çözelti karıştırma hızından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.19).

**Çizelge 4.19.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin *in vitro* ağız sindirim ortamında sığıla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | <i>In vitro</i> ağız sindirim ortamı salınımı (%) |          |            |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|----------|------------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı                              | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 1442,81                                           | 12,39    | 0,0002**   |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 46,81                                             | 5,63     | 0,0391*    |
| B- Sığıla yağı oranı (%)       | 1         | 625,28                                            | 75,20    | < 0,0001** |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 217,39                                            | 26,14    | 0,0005**   |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 104,31                                            | 12,54    | 0,0053**   |
| AB                             | 1         | 26,41                                             | 3,18     | 0,1051     |
| AC                             | 1         | 3,22                                              | 0,3875   | 0,5476     |
| AD                             | 1         | 0,7842                                            | 0,0943   | 0,7651     |
| BC                             | 1         | 167,35                                            | 20,13    | 0,0012*    |
| BD                             | 1         | 79,91                                             | 9,61     | 0,0113*    |
| CD                             | 1         | 3,96                                              | 0,4761   | 0,5059     |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 0,6155                                            | 0,0740   | 0,7911     |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 210,51                                            | 25,32    | 0,0005**   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 29,04                                             | 3,49     | 0,0912     |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 15,58                                             | 1,87     | 0,2010     |
| Kalıntı                        | 10        | 83,15                                             |          |            |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 38,20                                             | 0,8499   | 0,5686     |
| Saf hata                       | 5         | 44,95                                             |          |            |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>1525,97</b>                                    |          |            |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile sığıla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerinin *in vitro* ağız sindirim ortamı

salınımları %2,65 ve %23,32 aralığında tespit edilmiştir. Flaş nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları, çözelti karıştırma hızı hariç tüm proses değişkenlerinden istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu yöntemde, nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınım oranları zein konsantrasyonundan ( $p<0,05$ ), sığla yağı oranından ( $p<0,01$ ), organik faz akış hızı ( $p<0,05$ ) ve çözelti karıştırma hızından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.20).

**Çizelge 4.20.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin *in vitro* ağız sindirim ortamında sığla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

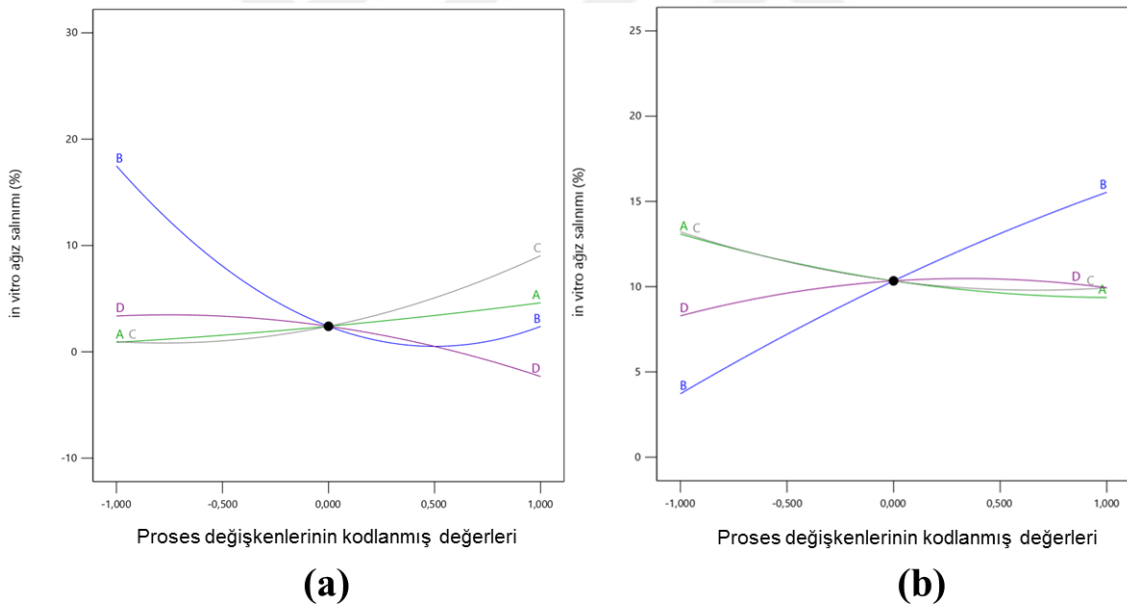
| Varyasyon Kaynağı              | SD        | <i>In vitro</i> ağız sindirim ortamı salınımı (%) |          |            |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|----------|------------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı                              | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 647,78                                            | 9,26     | 0,0006**   |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 34,38                                             | 6,88     | 0,0254*    |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1         | 342,98                                            | 68,66    | < 0,0001** |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 27,17                                             | 5,44     | 0,0419*    |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 7,48                                              | 1,50     | 0,2490     |
| AB                             | 1         | 3,34                                              | 0,6686   | 0,4326     |
| AC                             | 1         | 0,1971                                            | 0,0394   | 0,8465     |
| AD                             | 1         | 0,3444                                            | 0,0689   | 0,7982     |
| BC                             | 1         | 2,23                                              | 0,4461   | 0,5193     |
| BD                             | 1         | 0,3072                                            | 0,0615   | 0,8092     |
| CD                             | 1         | 0,0795                                            | 0,0159   | 0,9021     |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 3,95                                              | 0,7906   | 0,3948     |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 2,21                                              | 0,4432   | 0,5206     |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 5,27                                              | 1,06     | 0,3284     |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 5,85                                              | 1,17     | 0,3048     |
| Kalıntı                        | 10        | 49,95                                             |          |            |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 17,66                                             | 0,5471   | 0,7380     |
| Saf hata                       | 5         | 32,29                                             |          |            |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>697,73</b>                                     |          |            |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları Şekil 4.8'de pertürbasyon grafiklerinde gösterilmiştir. Her iki yöntemde de *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımlarını belirleyici proses değişkenleri zein konsantrasyonu ve sığla yağı oranıdır. Basit nanoçöktürme yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerinin zein konsantrasyonu ve organik solvent faz akış hızı arttıkça *in vitro* ağız sindirim ortamı salınım oranı artmış, sığla yağı oranı arttıkça

giderek azalmış bir yerden sonra artmaya başlamıştır. Çözelti karıştırma hızı arttıkça *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımlarında belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç, basit nanoçöktürme yönteminde karıştırma hızının stabil nanopartikül üretimine olanak sağlayarak, *in vitro* ağız sindirim ortamında partikül açılımını azaltmasından kaynaklanmış olabilir.

Flaş nanoçöktürme yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin sıgla yağı oranı arttıkça *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Öte yandan sıgla yağı oranı ve organik solvent faz akış hızı arttıkça *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları belirgin bir şekilde azalmıştır. Basit nanoçöktürme yönteminde nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları zein konsantrasyonu artışı ile bir miktar etkilenirken, flaş nanoçöktürme yönteminde ise zein konsantrasyonu artışı *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımlarını belirgin şekilde azaltmıştır.



**Şekil 4.8.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen sıgla yağı dolgulı ZNP'nin *in vitro* ağız sindirim ortamında SL salınımı üzerine proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

#### 4.3.6.2. *In vitro* Mide Ortamı Sığla Yağı Salınımı

Sığla yağının yüksek biyoaktif özellikleri sayesinde yüksek anti-ülserojenik etki gösterdiği ve gastrik koruma sağladığı bilinmektedir (Gurbuz vd., 2013; Lingbeck vd., 2015; Kültür vd., 2018). Bu nedenle, sığla yağının nanokapsül formunda vücuda alındığında *in vitro* mide ortamında maksimum açılım göstermesi ve kontrollü salınımla biyoyararlanımının ve sağlık etkilerinin artırılması amaçlanmaktadır.

Basit nanoçöktürme yöntemi ile sığla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerinin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları %27,64 ve %94,77 aralığında tespit edilmiştir. Basit nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları, sığla yağı oranından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.21).

**Çizelge 4.21.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin *in vitro* mide sindirim ortamında sığla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | <i>In vitro</i> mide sindirim ortamı salınımı (%) |          |          |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|----------|----------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı                              | F Değeri | p-Değeri |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 5925,77                                           | 3,72     | 0,0213*  |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 50,80                                             | 0,4465   | 0,5191   |
| B- Sığla yağı oranı (%)        | 1         | 3323,94                                           | 29,22    | 0,0003** |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 5,59                                              | 0,0491   | 0,8290   |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 501,48                                            | 4,41     | 0,0621   |
| AB                             | 1         | 62,68                                             | 0,5509   | 0,4750   |
| AC                             | 1         | 31,68                                             | 0,2784   | 0,6092   |
| AD                             | 1         | 82,94                                             | 0,7290   | 0,4132   |
| BC                             | 1         | 337,10                                            | 2,96     | 0,1159   |
| BD                             | 1         | 39,07                                             | 0,3434   | 0,5709   |
| CD                             | 1         | 302,10                                            | 2,66     | 0,1343   |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 208,35                                            | 1,83     | 0,2058   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 539,07                                            | 4,74     | 0,0545   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 2,30                                              | 0,0202   | 0,8897   |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 150,97                                            | 1,33     | 0,2761   |
| Kalıntı                        | 10        | 1137,74                                           |          |          |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 818,75                                            | 2,57     | 0,1620   |
| Saf hata                       | 5         | 318,99                                            |          |          |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>7063,51</b>                                    |          |          |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

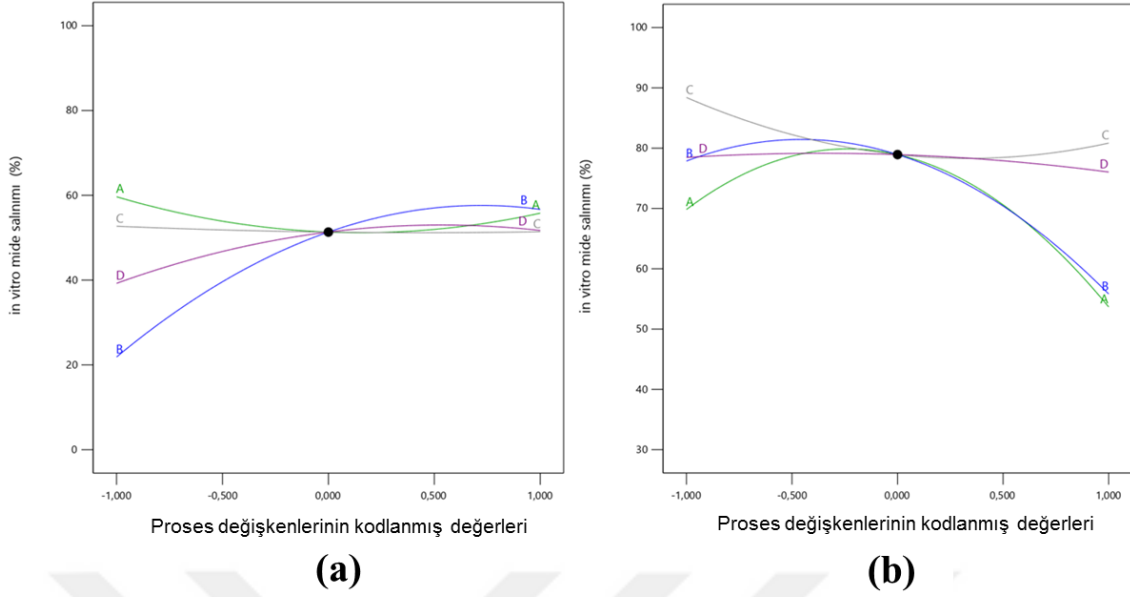
Flaş nanoçöktürme yöntemi ile sıgla yağı dolgulu zein nanopartikülleri üretiminde farklı proses koşullarında elde edilen nanopartiküllerinin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları %35,97 ve %90,58 aralığında tespit edilmiştir. Flaş nanoçöktürme ile üretilen nanopartiküllerin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları, zein konsantrasyonu ve sıgla yağı oranından istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilenmektedir (Çizelge 4.22).

**Çizelge 4.22.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen ZNP'nin *in vitro* mide sindirim ortamında sıgla yağı salınımı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

| Varyasyon Kaynağı              | SD        | <i>In vitro</i> mide sindirim ortamı salınımı (%) |          |            |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|----------|------------|
|                                |           | Hata Kareler Toplamı                              | F Değeri | p-Değeri   |
| <b>Model: Quadratic</b>        | 14        | 7287,87                                           | 11,44    | 0,0002**   |
| A- Zein konsantrasyonu (mg/ml) | 1         | 648,24                                            | 14,25    | 0,0036**   |
| B- Sıgla yağı oranı (%)        | 1         | 1193,20                                           | 26,23    | 0,0004**   |
| C- Akış hızı (ml/dk)           | 1         | 144,50                                            | 3,18     | 0,1050     |
| D- Karıştırma hızı (rpm)       | 1         | 16,04                                             | 0,3526   | 0,5658     |
| AB                             | 1         | 2467,67                                           | 54,24    | < 0,0001** |
| AC                             | 1         | 601,58                                            | 13,22    | 0,0046**   |
| AD                             | 1         | 469,90                                            | 10,33    | 0,0093**   |
| BC                             | 1         | 581,84                                            | 12,79    | 0,0050**   |
| BD                             | 1         | 751,26                                            | 16,51    | 0,0023**   |
| CD                             | 1         | 187,20                                            | 4,11     | 0,0700     |
| A <sup>2</sup>                 | 1         | 1474,29                                           | 32,41    | 0,0002**   |
| B <sup>2</sup>                 | 1         | 634,78                                            | 13,95    | 0,0039**   |
| C <sup>2</sup>                 | 1         | 111,69                                            | 2,46     | 0,1482     |
| D <sup>2</sup>                 | 1         | 11,03                                             | 0,2424   | 0,6331     |
| Kalıntı                        | 10        | 454,92                                            |          |            |
| Model uygunsuzluğu             | 5         | 397,90                                            | 6,98     | 0,0263     |
| Saf hata                       | 5         | 57,01                                             |          |            |
| <b>Toplam</b>                  | <b>24</b> | <b>7742,79</b>                                    |          |            |

\* $p<0,05$  ve \*\*  $p<0,01$  seviyesinde istatistiksel olarak önemli

Proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak zein nanopartiküllerinin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları Şekil 4.9'da pertürbasyon grafiklerinde gösterilmiştir. Basit nanoçöktürme yönteminde, sıgla yağı oranı ve karıştırma hızı arttıkça nanopartiküllerin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları artmaktadır. Flaş nanoçöktürme yönteminde ise zein konsantrasyonu ve sıgla yağı oranı arttıkça nanopartiküllerin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları azaldığı görülmektedir.



**Şekil 4.9.** Basit nanoçöktürme (a) ve flaş nanoçöktürme (b) yöntemleri ile elde edilen SL dolgulu ZNP'nin *in vitro* mide sindirim ortamında sıgla yağı salınımı proses koşullarının etkisini gösteren pertürbasyon grafikleri.

#### 4.4. Optimizasyon Çalışması ve Sonuçların Deneysel Doğrulaması

Nanoçöktürme yöntemi ile sıgla yağı dolgulu zein nanopartikül üretiminde bağımsız proses değişkenleri olarak seçilen zein konsantrasyonu, sıgla yağı oranı, organik solvent faz akış hızı ve çözelti karıştırma hızı minimum partikül boyutu, minimum boyut dağılımı (PDI), mutlak değerce maksimum zeta potansiyeli, maksimum enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* sindirim analizinde ağız ortamında minimum ve mide ortamında maksimum salınım gösteren koşulları sağlayacak şekilde desirability fonksiyonu yaklaşımı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında, basit nanoçöktürme yöntemi proses değişkenlerinden zein konsantrasyonu 5-10 mg/ml, sıgla yağı oranı %0,5-10, solvent faz akış hızı 50-150 ml/dk ve karıştırma hızı 100-300 rpm aralığında değişmiştir. Optimum noktanın belirlenmesinde desirability fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında optimum nokta için birbirine yakın 5 çözüm bulunmuştur (Çizelge 4.23). Basit nanoçöktürme yöntemi için optimum nokta olarak, programın belirlediği bu çözümlerden, ilk sırada yer alan faktör seviyeleri seçilmiş ve bu noktada zein konsantrasyonu 10,00 mg/ml, SL oranı %6,9 solvent faz akış hızı 50 ml/dk ve karıştırma hızı 284 rpm olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.23.** Basit nanoçöktürme yöntemi için desirability fonksiyonu yaklaşımıyla belirlenen optimum noktalar.

| Deneme | Zein konsantrasyonu (mg/ml) | Sığla yağı oranı (%) | Akış hızı (ml/dk) | Karıştırma hızı (rpm) | Partikül boyutu (nm) | PDI (%) | Zeta Potansiyeli, (mV) | EE (%) | Ağız ortamı salınım (%) | Mide ortamı salınım (%) | Desirability |
|--------|-----------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|---------|------------------------|--------|-------------------------|-------------------------|--------------|
| 1      | 10,00                       | 6,9                  | 50                | 284                   | 242,26               | 0,12    | -41,24                 | 50,52  | 0,00                    | 64,84                   | 0,772        |
| 2      | 10,00                       | 6,7                  | 50                | 282                   | 243,09               | 0,12    | -41,05                 | 52,89  | 0,00                    | 64,13                   | 0,772        |
| 3      | 10,00                       | 7,7                  | 50                | 274                   | 237,16               | 0,13    | -41,57                 | 50,58  | 1,20                    | 66,83                   | 0,767        |
| 4      | 10,00                       | 8,1                  | 50                | 279                   | 236,31               | 0,12    | -41,80                 | 49,35  | 1,54                    | 67,67                   | 0,765        |
| 5      | 10,00                       | 8,2                  | 50                | 260                   | 233,54               | 0,14    | -41,60                 | 51,55  | 2,46                    | 67,55                   | 0,759        |

Basit nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartikülleri üretiminde optimum nokta sonuçlarının doğrulaması, matematiksel olarak belirlenen optimum noktada; zein konsantrasyonu 10,00 mg/ml, SL oranı %6,9, solvent faz akış hızı 50 ml/dk ve karıştırma hızı 284 rpm olacak şekilde üretimler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 4 doğrulama denemesinin sonuçları, sonuçların ortalaması ve modelden tahminlenen değerler Çizelge 4.24’de verilmiştir.

**Çizelge 4.24.** Basit nanoçöktürme yöntemi için optimum nokta doğrulama denemeleri sonuçları.

| Deneme                      | Partikül boyutu (nm) | PDI (%) | Zeta Potansiyeli, (mV) | EE (%) | Ağız ortamı salınım (%) | Mide ortamı salınım (%) |
|-----------------------------|----------------------|---------|------------------------|--------|-------------------------|-------------------------|
| 1                           | 221,75               | 0,10    | -25,33                 | 70,68  | 2,85                    | 85,67                   |
| 2                           | 233,75               | 0,15    | -38,00                 | 70,67  | 2,88                    | 86,51                   |
| 3                           | 227,98               | 0,16    | -37,75                 | 71,63  | 2,60                    | 92,15                   |
| 4                           | 218,90               | 0,16    | -38,30                 | 71,99  | 2,60                    | 89,97                   |
| <b>Ortalama</b>             | 225,59               | 0,14    | -34,85                 | 71,24  | 2,73                    | 88,58                   |
| <b>Modelden tahminlenen</b> | 238,47               | 0,13    | -41,45                 | 50,97  | 1,04                    | 66,20                   |

Her bir yanıt için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak t-testi uygulanarak (t-testi-SPSS programı yardımıyla) belirlenmiştir. İstatistiksel sonuçlar Çizelge 4.25’de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.25.** Basit nanoçöktürme yöntemi için optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması.

| Yanıtlar                       | Tahminlenen değer | Deneysel Değer <sup>a</sup> | SH <sup>b</sup> | Fark  | % Hata <sup>c</sup> | p-Değeri |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|-------|---------------------|----------|
| <b>Partikül boyutu (nm)</b>    | 238,47            | 227,83±5,70                 | 5,70            | 10,64 | 5,70                | 0,030    |
| <b>PDI (%)</b>                 | 0,13              | 0,14±0,03                   | 0,03            | 0,01  | 7,14                | 0,448    |
| <b>Zeta Potansiyeli (mV)</b>   | -41,45            | -34,88±5,67                 | 5,67            | 6,61  | 18,94               | 0,000    |
| <b>EE(%)</b>                   | 50,97             | 71,24±0,58                  | 0,58            | 20,27 | 28,45               | 0,995    |
| <b>Ağız ortamı salınım (%)</b> | 1,04              | 2,73±0,13                   | 0,13            | 1,69  | 61,90               | 0,000    |
| <b>Mide ortamı salınım (%)</b> | 66,20             | 88,58±2,62                  | 2,62            | 22,38 | 25,27               | 0,001    |

a Deneysel sonuçlar standart sapma ile birlikte verilmiştir

b Ortalama standart hata

c %Hata =  $(|y_{den} - y_{tah}|/y_{den}) \times 100$

Doğrulama denemeleri sonucunda, basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen zein nanopartiküllerin analiz sonuçlarına göre partikül boyutu ve polidispersite indeksi değeri modelden tahminlenen değerlere yakındır. Zeta potansiyeli değeri modelin belirlediği sınırlar içinde bulunmamış ve enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* ağız ve mide sindirim ortamındaki salınım değerleri deneysel olarak modelden tahminlenen değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği değerleri için model ve deneysel veriler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $p>0,05$ ).

Optimizasyon çalışmasında, flaş nanoçöktürme yöntemi proses değişkenlerinden zein konsantrasyonu 5-10 mg/ml, sıgla yağı oranı %3-7, solvent faz akış hızı 50-200 ml/dk ve karıştırma hızı 250-1000 rpm aralığında değişmiştir. Optimum noktanın belirlenmesinde desirability fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında optimum nokta için birbirine yakın 5 çözüm bulunmuştur (Çizelge 4.26). Flaş nanoçöktürme yöntemi için optimum nokta olarak, programın belirlediği bu çözümlerden, ilk sırada yer alan faktör seviyeleri seçilmiş ve bu noktada zein konsantrasyonu 10,00 mg/ml, SL oranı %3, solvent faz akış hızı 50 ml/dk ve karıştırma hızı 732 rpm olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.26.** Flaş nanoçöktürme yöntemi için desirability fonksiyonu yaklaşımıyla belirlenen optimum noktalar.

| Deneme | Zein konsantrasyonu (mg/ml) | Sığla yağı oranı (%) | Akış hızı (ml/dk) | Karıştırma hızı (rpm) | Partikül boyutu (nm) | PDI (%) | Zeta Potansiyel (mV) | EE (%) | Ağız ortamı salınım (%) | Mide ortamı salınım (%) | Desirability |
|--------|-----------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|---------|----------------------|--------|-------------------------|-------------------------|--------------|
| 1      | 10,00                       | 3,0                  | 50                | 995,7                 | 189,30               | 0,12    | 29,15                | 89,53  | 5,87                    | 100                     | 0,815        |
| 2      | 9,95                        | 3,0                  | 50                | 1000                  | 189,18               | 0,12    | 29,22                | 89,25  | 5,83                    | 100                     | 0,814        |
| 3      | 10,00                       | 3,0                  | 50                | 938                   | 188,18               | 0,12    | 28,31                | 89,21  | 6,06                    | 98,45                   | 0,807        |
| 4      | 10,00                       | 3,0                  | 51                | 795                   | 185,70               | 0,12    | 26,78                | 88,55  | 6,23                    | 93,06                   | 0,798        |
| 5      | 9,98                        | 3,0                  | 50                | 748                   | 184,24               | 0,12    | 26,40                | 88,19  | 6,30                    | 91,57                   | 0,790        |

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile zein nanopartikülleri üretiminde optimum nokta sonuçlarının doğrulaması, matematiksel olarak belirlenen optimum noktada; zein konsantrasyonu 10,00 mg/ml, SL oranı %3, solvent faz akış hızı 50 ml/dk ve karıştırma hızı 995 rpm olacak şekilde üretimler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 4 doğrulama denemesinin sonuçları, sonuçların ortalaması ve modelden tahminlenen değerler Çizelge 4.27’de verilmiştir.

**Çizelge 4.27.** Flaş nanoçöktürme yöntemi için optimum nokta doğrulama denemeleri sonuçları.

| Deneme                      | Partikül boyutu (nm) | PDI (%) | Zeta Potansiyeli(mV) | EE (%) | Ağız ortamı salınım (%) | Mide ortamı salınım (%) |
|-----------------------------|----------------------|---------|----------------------|--------|-------------------------|-------------------------|
| 1                           | 186,15               | 0,12    | 27,33                | 83,81  | 1,81                    | 54,14                   |
| 2                           | 181,29               | 0,19    | 21,67                | 85,13  | 1,75                    | 58,05                   |
| 3                           | 183,02               | 0,19    | 25,80                | 80,67  | 1,69                    | 56,44                   |
| 4                           | 182,29               | 0,24    | 28,70                | 80,95  | 1,72                    | 64,06                   |
| <b>Ortalama</b>             | 183,18               | 0,18    | 25,87                | 82,64  | 1,74                    | 58,17                   |
| <b>Modelden tahminlenen</b> | 187,32               | 0,12    | 27,97                | 88,94  | 6,05                    | 96,61                   |

Her bir yanıt için, optimum nokta doğrulama denemelerinden elde edilen ortalama sonuçlar ile modelden tahminlenen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak t-testi uygulanarak (t-testi-SPSS programı yardımıyla) belirlenmiştir. İstatistiksel sonuçlar Çizelge 4.28’de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.28.** Flaş nanoçöktürme yöntemi için optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması.

| Yanıtlar                       | Tahminlenen değer | Deneysel Değer <sup>a</sup> | SH <sup>b</sup> | Fark  | % Hata <sup>c</sup> | p-Değeri |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|-------|---------------------|----------|
| <b>Partikül boyutu (nm)</b>    | 187,32            | 183,18±4,08                 | 4,08            | 4,13  | 2,25                | 0,029    |
| <b>PDI (%)</b>                 | 0,12              | 0,18±0,03                   | 0,03            | 0,07  | 36,84               | 0,078    |
| <b>Zeta Potansiyeli (mV)</b>   | 27,97             | 25,87±2,52                  | 2,52            | 2,10  | 8,08                | 0,262    |
| <b>EE(%)</b>                   | 88,94             | 82,64±1,88                  | 1,88            | 6,30  | 7,62                | 0,010    |
| <b>Ağız ortamı salınım (%)</b> | 6,05              | 1,74±0,04                   | 0,04            | 4,31  | 247,70              | 0,000    |
| <b>Mide ortamı salınım (%)</b> | 96,61             | 58,17±3,67                  | 3,67            | 38,44 | 66,08               | 0,000    |

a Deneysel sonuçlar standart sapma ile birlikte verilmiştir

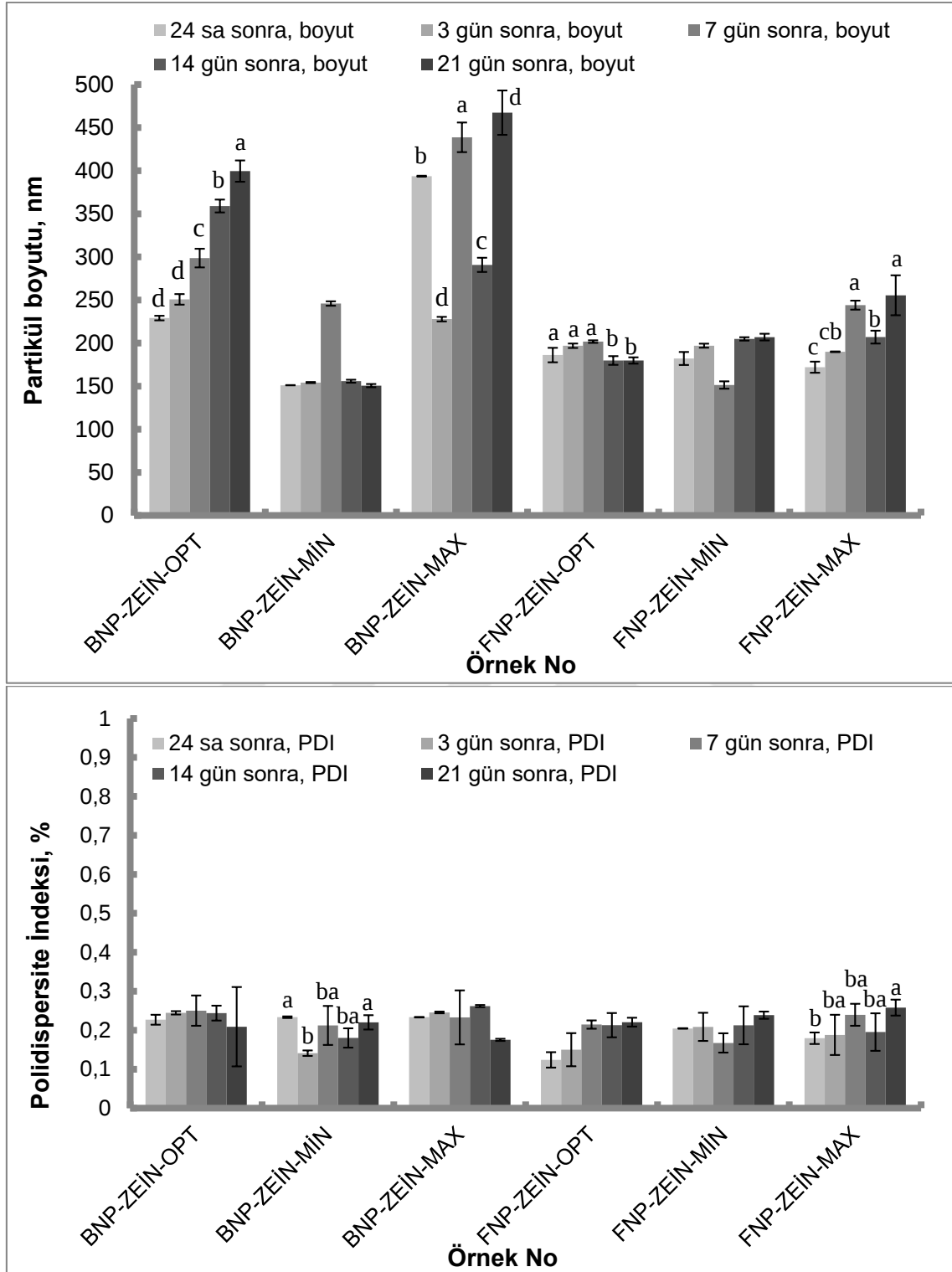
b Ortalama standart hata

c %Hata =  $(|y_{den} - y_{tah}|/y_{den}) \times 100$

Doğrulama denemeleri sonucunda, basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen zein nanopartiküllerin analiz sonuçlarına göre partikül boyutu, zeta potansiyel değeri ve enkapsülasyon etkinliği değerleri modelden tahminlenen değerlere yakındır. Polidispersite değeri ve *in vitro* ağız ve mide sindirim ortamlarındaki salınım değerleri deneysel olarak modelden tahminlenen değerlerden daha düşük bulunmuştur. Polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri için model ve deneysel veriler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $p>0,05$ ).

#### 4.5. Kolloidal Zein Nanopartiküllerinin Stabilizasyon Çalışması

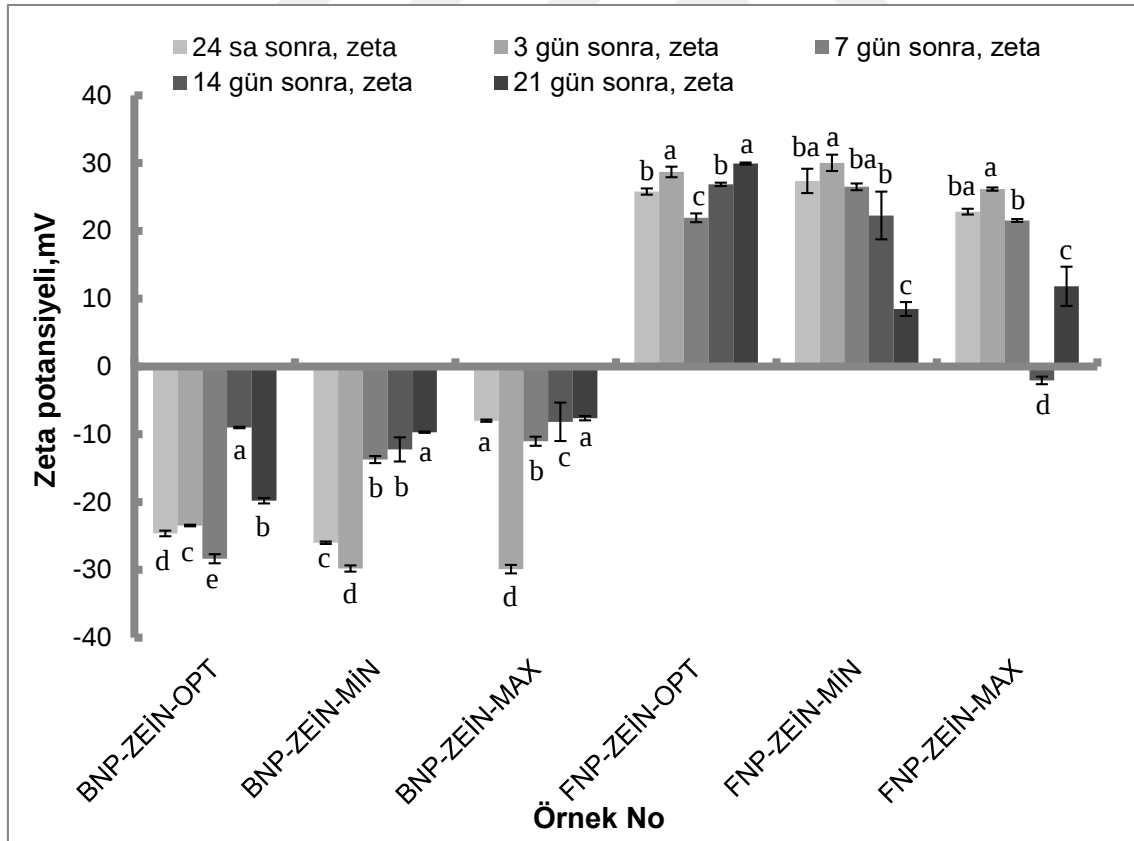
Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile belirlenen optimum nanopartiküller ve deneme deseninden seçilen sıgla yağı oranına göre minimum ve maksimum oranda dolgulu nanopartiküller üretildikten sonra kolloidal dispersiyonlar halinde üç hafta süresince +4°C’de stoklanarak partikül stabilitesi incelenmiştir. Yöntemlerden, basit nanoçöktürme yöntemi BNP, flaş nanoçöktürme yöntemi ise FNP ile kodlanmıştır. Deneme desenlerine bağlı kalınarak, BN yöntemi sıgla yağı oranı minimum %0,5 ve maksimum %10 olarak; FNP yöntemi sıgla yağı oranı minimum %3 ve maksimum %7 olarak çalışılmıştır. Her iki yöntemde de zein konsantrasyonu 10 mg/ml olarak sabit tutulmuş diğer proses değişkenleri her iki yöntemin optimum noktasında belirlenen koşullara göre çalışılmıştır. Stabilitate analizleri: üretim, 24 saat sonra, 3 gün sonra, 7 gün sonra, 14 gün sonra ve 21 gün sonra olmak üzere partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), transmitans (geçirgenlik) ve zeta potansiyeli ölçümleri ile gerçekleştirilmiş, analiz sonuçları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’deki grafiklerde verilmiştir.



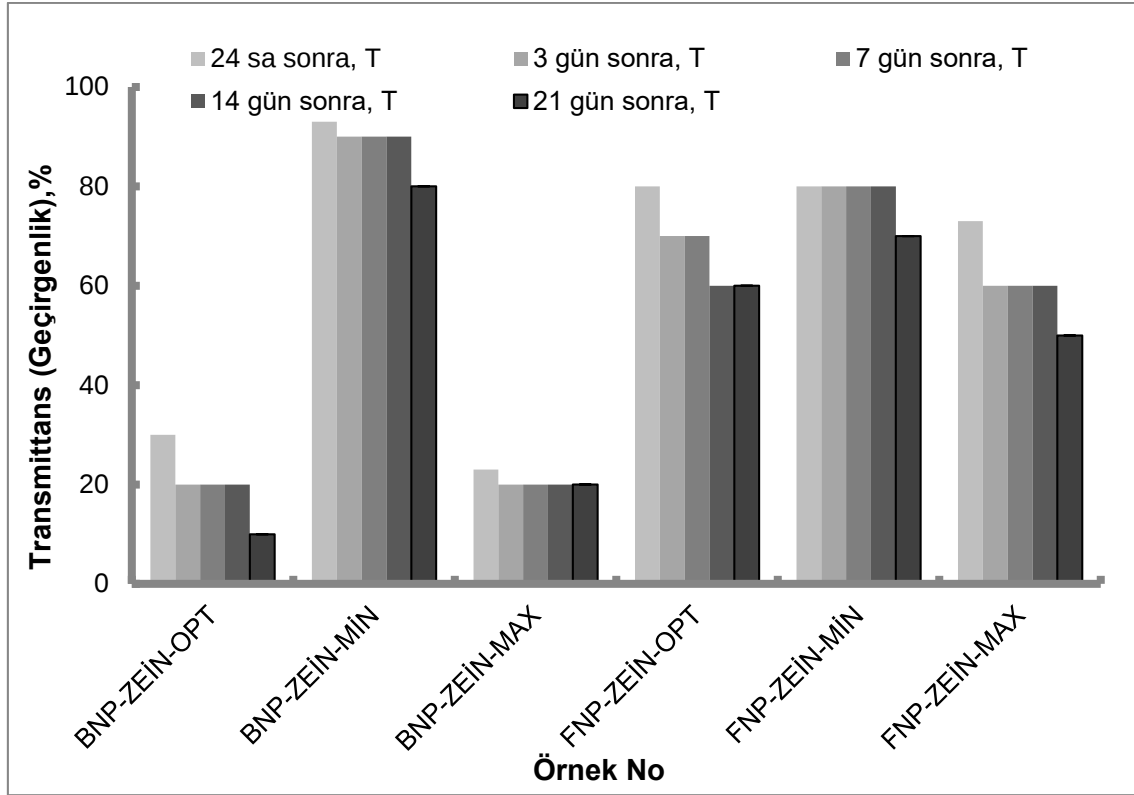
**Şekil 4.10.** Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ZNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

Şekil 4.10'da BNP ve FNP yöntemleri ile üretilen optimum, maksimum ve minimum sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin partikül boyutu ve polidispersite

indeksi değerlerinin zamana bağlı değişimi görülmektedir. Grafiğe göre, FNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu değişimi BNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllere göre daha dar bir aralıkta gerçekleşmiştir. Optimum zein nanopartiküllerinin partikül boyutu değişimi BNP yönteminde daha yüksek bir artış gösterirken, FNP yönteminde daha düşük bir artış göstermiştir. Tüm nanopartiküllerin, partikül boyutları 21 gün sonunda BNP yöntemi için 150,66 nm ve 467,33 nm aralığında iken, FN yöntemi için 179,87 nm ve 255,46 nm aralığında tespit edilmiştir. FNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin polidispersite indeksi artışı BNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllere göre daha yavaş gerçekleşmiştir. Optimum zein nanopartiküllerinin polidispersite indeksi değişimi BNP yönteminde daha yüksek bir artış gösterirken, FNP yönteminde daha düşük bir artış göstermiştir. Tüm nanopartiküllerin, polidispersite indeksleri 21 gün sonunda BNP yöntemi için %0,18 - %0,22 aralığında iken, FNP yöntemi için %0,22 - %0,25 aralığında tespit edilmiştir.



**Şekil 4.11.** Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ZNP'nin zeta potansiyeli ve transmittans (geçirgenlik) değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği.



**Şekil 4.11.** Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgulu ZNP'nin zeta potansiyeli ve transmittans (geçirgenlik) değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği. (Devamı)

Şekil 4.11'de BNP ve FNP yöntemleri ile üretilen optimum ve maksimum ve minimum sıgla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin zeta potansiyeli ve geçirgenlik (transmittans) değerlerinin zamana bağlı değişimi görülmektedir. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri incelendiğinde tüm üretimlerin 3 gün sonra en yüksek zeta potansiyel değerine ulaştığı ve  $\pm 25$  mV 'un üzerinde stabil nanopartiküller elde edildiği görülmüştür. Üretim sonrasında partiküllerin stabiliteleri 3 gün süresince artmaktadır. 7 gün sonra zeta potansiyel değerlerinin azaldığı görülmüştür. BNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri FNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllere göre daha kararsızdır. Optimum zein nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerine bakıldığında FNP yönteminde zamana bağlı hafif azalma gözlenirken, BNP yönteminde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Tüm nanopartiküllerin, zeta potansiyel değerleri 21 gün sonunda BNP yöntemi için -19,80 mV ve -7,63 mV aralığında iken, FNP yöntemi için +29,93 mV ve +8,46 mV aralığında tespit edilmiştir. Grafiğe göre, FNP yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin geçirgenlik değerleri BNP

yöntemiyle elde edilen nanopartiküllere göre daha yüksektir. BNP-minimum örneğinin yüksek geçirgenlik değerine sahip olmasının nedeni içeriğindeki sıgla yağı oranının çok düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Optimum zein nanopartiküllerinin geçirgenlik değerlerinin zamana bağlı olarak bir miktar azaldığı görülmüştür. Tüm nanopartiküllerin, geçirgenlik değerleri 21 gün sonunda BNP yöntemi için %10 ve %80 aralığında iken, FNP yöntemi için %50 ve %70 aralığında tespit edilmiştir.

#### 4.6. Poli $\epsilon$ -kaprolakton (PCL) Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Poli- $\epsilon$ -kaprolakton (PCL), biyomedikal uygulamalarda yaygın kullanılan ABD Gıda ve İlaç idaresinden (FDA) onaylı, biyoçözünür, implante olabilen ve terapötik moleküllerin geciktirilmiş salınım çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir biyomalzemedir (Ramanujam vd., 2018). Sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL nanopartikülleri basit nanoçöktürme ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile üretilmiştir.

Basit nanoçöktürme yönteminde, PCL konsantrasyonu %1, organik solvent faz akış hızı 200 ml/dk ve karıştırma hızı 750 rpm olarak belirlenen sabit proses koşullarında sıgla yağı oranı kütlece %0,5-1-2-3-5-7 oranlarında değiştirilerek nanoenkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Üretimlerde, %0,5 SL içeren numune PCL+SL0,5, %1 SL içeren numune PCL+SL1, %2 SL içeren numune PCL+SL2, %3 SL içeren numune PCL+SL3, %5 SL içeren numune PCL+SL5 ve %7 SL içeren numune PCL+SL7 olarak kodlanmıştır.

Sıgla yağı dolgusuz PCL nanopartiküllerinin homojen, yarı saydam ve sütlü-mavi opalesans dispersiyon oluşturdıkları çözelti, solvent-antisolvent-polimer diyagramında uzo bölgesi koşullarının sağlandığını göstermektedir (Botet, 2012). Bu nedenle öncelikle, taşıyıcı PCL polimerinin nanoenkapsülasyonda kullanım miktarı, uzo bölgesinin olduğu aralık göz önüne alınarak belirlenmiştir. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartikülleri, sıgla yağı oranı arttıkça homojen, sütlü mavi ve opak (milky blue opalescence) dispersiyon oluşturdıkları gözlenmiştir (Resim 4.2). Bu durumun oluşum nedeni, kolloidal nanopartiküllerin anlık olarak oluşması ve görünür ışığı güçlü bir şekilde saçmasıdır (Botet, 2012).



**Resim 4.2.** Basit nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL kolloidal dispersiyonların görünümü.

PCL polimerinin kolloidal çözelti oluşturabilmesi ve nano boyutta kapsül stabilizasyonu sağlanması için anti-solvent faz içinde polivinil alkol (PVA) kullanılmıştır. Farklı sıgla yağı oranlarında üretilen nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), geçirgenlik (transmittans), zeta potansiyeli (ZP) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) üzerine sıgla yağı oranının etkileri incelenmiştir. Öte yandan, *in vitro* statik sindirim analizi yapılarak ağız ve mide ortamında sıgla yağı salınım profilleri ve miktarları belirlenmiştir. Deneysel verilerin karşılaştırılabilmesi için istatistiksel hesaplamalar SAS, Institute (Cary, NC, ABD) tarafından hazırlanan “The SAS system for Windows V7” paket programı kullanılarak varyans analizi gerçekleştirilmiştir ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılmıştır. Elde edilen deneysel yanıtlar Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30’de ve varyans sonuçları Çizelge 4.31’de sunulmuştur.

**Çizelge 4.29.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin ürün özellikleri üzerine sıgla yağı oranı etkisinin deneysel sonuçları.

|                              | Dolgusuz<br>PCL | PCL+<br>SL 0,5               | PCL+<br>SL1                  | PCL+<br>SL2                  | PCL+<br>SL3                  | PCL+<br>SL5                  | PCL+<br>SL7                  |
|------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Partikül boyutu (nm)</b>  | 220,80<br>±1,27 | 258,67 <sup>e</sup><br>±6,65 | 267,50 <sup>e</sup><br>±7,32 | 298,10 <sup>d</sup><br>±0,56 | 361,63 <sup>c</sup><br>±8,46 | 430,23 <sup>b</sup><br>±5,58 | 510,00 <sup>a</sup><br>±5,95 |
| <b>PDI (%)</b>               | 0,07<br>±0,04   | 0,15 <sup>a</sup><br>±0,05   | 0,16 <sup>a</sup><br>±0,06   | 0,15 <sup>a</sup><br>±0,044  | 0,18 <sup>a</sup><br>±0,04   | 0,25 <sup>a</sup><br>±0,004  | 0,21 <sup>a</sup><br>±0,02   |
| <b>Geçirgenlik (%)</b>       | 100±0,00        | 100±0,00                     | 80±0,00                      | 70±0,00                      | 60±0,00                      | 50±0,00                      | 20±0,00                      |
| <b>Zeta potansiyeli (mV)</b> | -10,53<br>±0,14 | -29,73 <sup>b</sup><br>±1,19 | -29,97 <sup>b</sup><br>±0,08 | -31,17 <sup>b</sup><br>±2,05 | -22,73 <sup>a</sup><br>±0,49 | -31,77 <sup>b</sup><br>±0,44 | -29,03 <sup>b</sup><br>±0,36 |
| <b>EE (%)</b>                | -               | 78,79 <sup>b</sup><br>±0,01  | 80,26 <sup>b</sup><br>±0,50  | 81,45 <sup>b</sup><br>±0,42  | 87,36 <sup>a</sup><br>±1,00  | 67,64 <sup>c</sup><br>±0,01  | 70,07 <sup>c</sup><br>±0,52  |
| <b>Ürün verimi (%)</b>       | -               | 80,88                        | 76,80                        | 60,94                        | 39,84                        | 26,70                        | 22,27                        |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların  $p<0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.30.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin *in vitro* sindirim ortamlarında salınımları üzerine sıgla yağı oranı etkisinin deneysel sonuçları.

|                                          | Sıgla<br>yağı | PCL+<br>SL 0,5              | PCL+<br>SL1                 | PCL+<br>SL2                 | PCL+<br>SL3                 | PCL+<br>SL5                 | PCL+<br>SL7                 |
|------------------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Ağız ortamı TSA oranı (%)</b>         | 100           | 1,59 <sup>e</sup><br>±0,04  | 2,31 <sup>d</sup><br>±0,01  | 2,36 <sup>d</sup><br>±0,00  | 3,66 <sup>c</sup><br>±0,05  | 4,44 <sup>b</sup><br>±0,12  | 4,92 <sup>a</sup><br>±0,12  |
| <b>Ağız ortamı TSA miktarı (mg/g KM)</b> | 18,02         | 0,304                       | 0,449                       | 0,461                       | 0,707                       | 0,892                       | 0,941                       |
| <b>Mide ortamı TSA oranı (%)</b>         | 100           | 34,70 <sup>e</sup><br>±0,01 | 37,19 <sup>d</sup><br>±0,06 | 58,92 <sup>c</sup><br>±0,01 | 63,85 <sup>b</sup><br>±0,24 | 67,73 <sup>a</sup><br>±0,08 | 69,03 <sup>a</sup><br>±0,71 |
| <b>Mide ortamı TSA miktarı (mg/g KM)</b> | 16,71         | 0,630                       | 0,674                       | 1,061                       | 1,164                       | 1,231                       | 1,241                       |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların  $p<0.05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.31.** Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin deneysel verilerine ait varyans analiz sonuçları.

|                    | Partikül size (nm) |            |          | PDI (%)                   |          | Zeta değerleri (mV)       |           |
|--------------------|--------------------|------------|----------|---------------------------|----------|---------------------------|-----------|
|                    | SD                 | KO         | F        | KO                        | F        | KO                        | F         |
| <b>Sıgla Oranı</b> | 5                  | 29940.3209 | 253.30** | 0.00423164                | 0.61     | 31.8400000                | 10.23**   |
| <b>Hata</b>        | 12                 | 118.2017   |          | 0.00694758                |          | 3.1133333                 |           |
|                    | EE (%)             |            |          | Ağız ortamı TSA oranı (%) |          | Mide ortamı TSA oranı (%) |           |
|                    | SD                 | KO         | F        | KO                        | F        | KO                        | F         |
| <b>Sıgla Oranı</b> | 5                  | 109.804353 | 185.32** | 3.52415180                | 341.98** | 472.540915                | 1757.69** |
| <b>Hata</b>        | 6                  | 0.5925167  |          | 0.01030517                |          | 0.268842                  |           |

\* $p<0,05$  ve \*\* $p<0,01$

Basit nanoçöktürme yöntemi ile PCL nanopartikülleri üretiminde sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin (SL-PCL-NP) partikül boyutları 258,67 nm ve 510,00 nm arasında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz PCL-NP boyutu ise 220,80 nm olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP boyutunu istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Kapsüllenen sıgla yağı oranı arttıkça partikül boyutunda pozitif yönlü bir artış görülmüştür. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin polidispersite indeksi (PDI) %0,15- %0,25 aralığında bulunmuştur ve dar bir boyut dağılıma sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz PCL-NP'nin polidispersite indeksi ise %0,07 olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP'nin polidispersite indeksi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli düzeyde görülmemiştir. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin geçirgenlik değerleri sıgla yağı oranı arttıkça belirgin bir şekilde azalmıştır. Artan sıgla yağı ile oluşan kolloidal nanopartikül oranı artmasına bağlı olarak dispersiyonun ışık geçirgenliği düşmüştür. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri -22,73 mV ve -31,77 mV aralığında ölçülmüştür. Bu yöntemle üretilen dolgusuz PCL-NP'nin zeta potansiyel değeri ise -10,53 mV olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP'nin zeta potansiyel değerlerini istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Kolloidal stabilitesi en yüksek olan denemelerin mutlak değerce en yüksek zeta potansiyel değerine sahip olan PCL+SL2 ve PCL+SL5 örnekleri olduğu görülmüştür. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri %87,36 ve %67,64 aralığında hesaplanmıştır. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP enkapsülasyon etkinliklerini istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça, polimerin kapsülleme gücü azaldığından enkapsülasyon etkinliği değerinin düştüğü görülmüştür. SL-PCL-NP'nin ürün verimi değerleri de enkapsülasyon etkinliği değerlerine benzer bir şekilde sıgla yağı oranı arttıkça dramatik olarak azalmıştır.

Poli-ε-kaprolakton, düşük molekül ağırlıklı yapısı ile vücut içinde enzimatik olmayan hidroliz ile ester gruplarının kırılması yoluyla parçalanır ve hücre içine bozulmadan geçebilir (Ramanujam vd., 2018). Basit nanoçöktürme ile üretilen sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin statik *in vitro* sindirim ortamlarındaki sıgla yağı salınım oranları ve trans-sinamik asit miktarları ağız ve mide ortam sıvıları simüle edilerek gerçekleştirilmiştir. PCL+SL0,5, PCL+SL1, PCL+SL2, PCL+SL3, PCL+SL5 ve PCL+SL7 nanopartiküllerinin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları sırasıyla

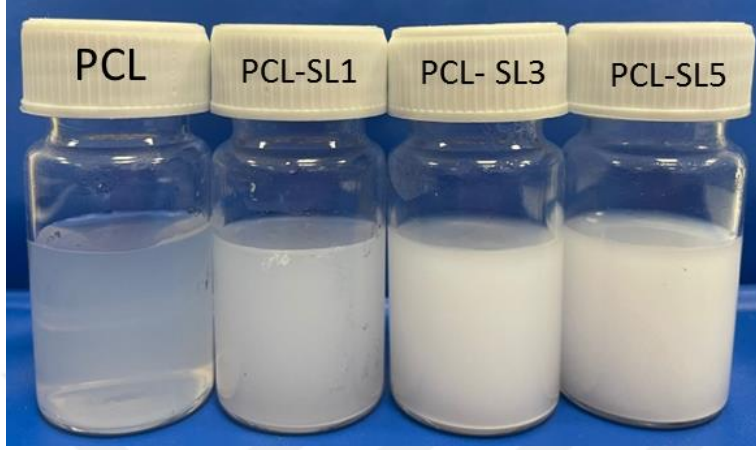
%1,59, %2,31, %2,36, %3,66, %4,44 ve %4,92 olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımlarını istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça, *in vitro* ağız sindirim ortamında salınan sıgla yağı oranının ve trans-sinamik asit miktarının arttığı görülmüştür. PCL+SL0,5, PCL+SL1, PCL+SL2, PCL+SL3, PCL+SL5 ve PCL+SL7 nanopartiküllerinin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları sırasıyla %34,70, %37,19, %58,92, %63,85, %67,73 ve %69,03 olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, nanopartiküllerin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımlarını istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça, *in vitro* mide sindirim ortamında sıgla yağı salınım oranının ve trans-sinamik asit miktarının arttığı görülmüştür.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, basit nanoçöktürme yöntemi ile PCL nanopartikülleri üretiminde, partikül boyutu <300 nm, dar boyut dağılımlı, mutlak değerce yüksek zeta potansiyeline sahip, yüksek enkapsülasyon etkinliğine ve kaplama verimine sahip ve *in vitro* sindirim analizinde ağız ortamında düşük mide ortamında yüksek açılım gösteren denemenin PCL-SL2 olduğu görülmüş ve basit nanoçöktürme yöntemi ile PCL-NP üretiminde optimum üretim olarak seçilmiştir.

Flaş nanoçöktürme yönteminde, PCL konsantrasyonu %1, organik solvent fazı akış hızı 200 ml/dk ve karıştırma hızı 1000 rpm olarak belirlenen sabit proses koşullarında sıgla yağı oranı kütlece %1-3-5 oranlarında değiştirilerek nanoenkapsülasyon yapılmıştır. Üretimlerde, %1 SL içeren numune PCL-SL1, %3 SL içeren numune PCL-SL3 ve %5 SL içeren numune PCL-SL5 olarak kodlanmıştır.

PCL polimerinin kolloidal çözelti oluşturabilmesi ve nano boyutta kapsül stabilizasyonu sağlanması için anti-solvent faz içinde polivinil alkol (PVA) kullanılmıştır. Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL nanopartiküllerinin kolloidal dispersiyon görünimleri Resim 4.3'de verilmiştir. Resim 4.3'de görüldüğü gibi dolgusuz PCL nanopartiküllerinin homojen, yarı saydam ve sütlü-mavi opalesans görünümünün sıgla yağı dolgusuyla birlikte homojen sütlü mavi (milky blue) bir hal aldığı ve sıgla yağı oranı arttıkça homojen, koyu sütlü beyaz ve opak dispersiyonlar oluşturduğu gözlenmiştir. Farklı sıgla yağı oranlarında üretilen nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), geçirgenlik, zeta potansiyeli (ZP), bulanıklık ve enkapsülasyon etkinliği (EE) üzerine sıgla yağı oranının

etkisi incelenmiştir. Öte yandan, *in vitro* statik sindirim analizi yapılarak ağız ve mide ortamında sıgla yağı salınım oranları belirlenmiştir.



**Resim 4.3.** Flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL kolloidal dispersiyonların görünümü.

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), geçirgenlik (transmittans), zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği (EE) ve *in vitro* sindirim (ağız ve mide) ortamlarında salınımları üzerine sıgla yağı oranının etkileri incelenmiştir. Deneysel verilerin karşılaştırılabilmesi için istatistiki hesaplamalar SAS, Institute (Cary, NC, ABD) tarafından hazırlanan “The SAS system for Windows V7” paket programı kullanılarak varyans analizi gerçekleştirilmiştir ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre karşılaştırılmıştır. Elde edilen deneysel yanıtlar Çizelge 4.32 ve Çizelge 4.33’de ve varyans sonuçları Çizelge 4.34’de sunulmuştur.

**Çizelge 4.32.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin ürün özellikleri üzerine sıgla yağı oranı etkisinin deneysel sonuçları.

|                       | Dolgusuz PCL | PCL-SL1                   | PCL-SL3                   | PCL-SL5                   |
|-----------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Partikül boyutu (nm)  | 171,84±1,17  | 225,88 <sup>c</sup> ±2,66 | 255,46 <sup>b</sup> ±0,49 | 383,93 <sup>a</sup> ±0,43 |
| PDI (%)               | 0,17±0,06    | 0,12 <sup>ba</sup> ±0,00  | 0,09 <sup>b</sup> ±0,05   | 0,23 <sup>a</sup> ±0,02   |
| Geçirgenlik (%)       | 100±0,00     | 100±0,00                  | 90±0,00                   | 50±0,00                   |
| Zeta potansiyeli (mV) | -23,47±0,28  | -18,43 <sup>a</sup> ±1,33 | -32,46 <sup>c</sup> ±0,62 | -28,83 <sup>b</sup> ±0,38 |
| EE (%)                | -            | 76,61 <sup>a</sup> ±0,56  | 71,20 <sup>b</sup> ±1,41  | 63,00 <sup>c</sup> ±0,75  |
| Ürün verimi (%)       | -            | 80,60                     | 94,81                     | 90,17                     |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların  $p<0,05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.33.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin *in vitro* sindirim ortamında salınımları üzerine sıgla yağı oranının etkisinin deneysel sonuçları.

|                                   | Sıgla yağı | PCL-SL1                  | PCL-SL3                  | PCL-SL5                  |
|-----------------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ağız ortamı TSA oranı (%)         | 100        | 2,88 <sup>b</sup> ±0,51  | 5,12 <sup>ba</sup> ±0,26 | 7,11 <sup>a</sup> ±0,85  |
| Ağız ortamı TSA miktarı (mg/g KM) | 18,023     | 0,562                    | 0,997                    | 1,385                    |
| Mide ortamı TSA oranı (%)         | 100        | 52,13 <sup>c</sup> ±0,84 | 64,10 <sup>b</sup> ±0,29 | 75,00 <sup>a</sup> ±0,84 |
| Mide ortamı TSA miktarı (mg/g KM) | 16,713     | 0,941                    | 1,157                    | 1,354                    |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların  $p<0,05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.34.** Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin deneysel verilerine ait varyans analiz sonuçları.

|             | Partikül size (nm) |          |           | PDI (%)                   |        | Zeta değerleri (mV)       |          |
|-------------|--------------------|----------|-----------|---------------------------|--------|---------------------------|----------|
|             | SD                 | KO       | F         | KO                        | F      | KO                        | F        |
| Sıgla Oranı | 2                  | 20893,81 | 2783,68** | 0,0150                    | 12,13* | 159,1477                  | 291,12** |
| Hata        | 6                  | 7,51     |           | 0,0012                    |        | 0,5466                    |          |
|             | EE (%)             |          |           | Ağız ortamı TSA oranı (%) |        | Mide ortamı TSA oranı (%) |          |
|             | SD                 | KO       | F         | KO                        | F      | KO                        | F        |
| Sıgla Oranı | 2                  | 140,8160 | 49,15**   | 13,4676                   | 12,61* | 392,5639                  | 260,65*  |
| Hata        | 6                  | 2,8647   |           | 1,0681                    |        | 1,5060                    |          |

\* $p<0,05$  ve \*\* $p<0,01$

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile PCL nanopartikülleri üretiminde sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin (SL-PCL-NP) partikül boyutları 225,88 nm ve 383,93 nm arasında değişim göstermiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz PCL-NP boyutu ise

171,84 nm olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP boyutunu istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Kapsüllenen sıgla yağı oranı arttıkça partikül boyutunun da arttığı görülmüştür. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin polidispersite endeksi (PDI) %0,09 - %0,23 aralığında bulunmuş ve dar bir boyut dağılıma sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu yöntemle üretilen dolgusuz PCL-NP'nin polidispersite indeksi ise %0,17 olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP'nin polidispersite indeksini istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilemektedir. En düşük polidispersite endeksi, PCL-SL3 kodlu örnekte tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı arttıkça dispersiyon içinde oluşan kolloidal nanopartiküllerin ışık geçirgenliği düşürmesine bağlı olarak nanopartiküllerin geçirgenlik oranları giderek azalmıştır. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri -18,43 mV ve -28,83 mV aralığında ölçülmüştür. Bu yöntemle üretilen dolgusuz PCL-NP'nin zeta potansiyel değeri ise -23,47 mV olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP'nin zeta potansiyel değerlerini istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Kolloidal stabilitesi en yüksek olan denemenin mutlak değerce en yüksek zeta potansiyel değerine sahip olan PCL-SL3 kodlu örnek olduğu görülmüştür. Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri incelendiğinde %76,61 ve %63,00 aralığında oldukları görülmüştür. Sıgla yağı oranı, SL-PCL-NP enkapsülasyon etkinliklerini istatistiksel olarak önemli ( $p<0,01$ ) düzeyde etkilemektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça, polimerin kapsülleme gücü azaldığından enkapsülasyon etkinliği değerinin düştüğü görülmüştür. SL-PCL-NP'nin ürün verimi değerleri ise enkapsülasyon etkinliği değerlerinden farklı olarak sıgla yağı oranı ile pozitif yönlü bir korelasyon göstermiştir.

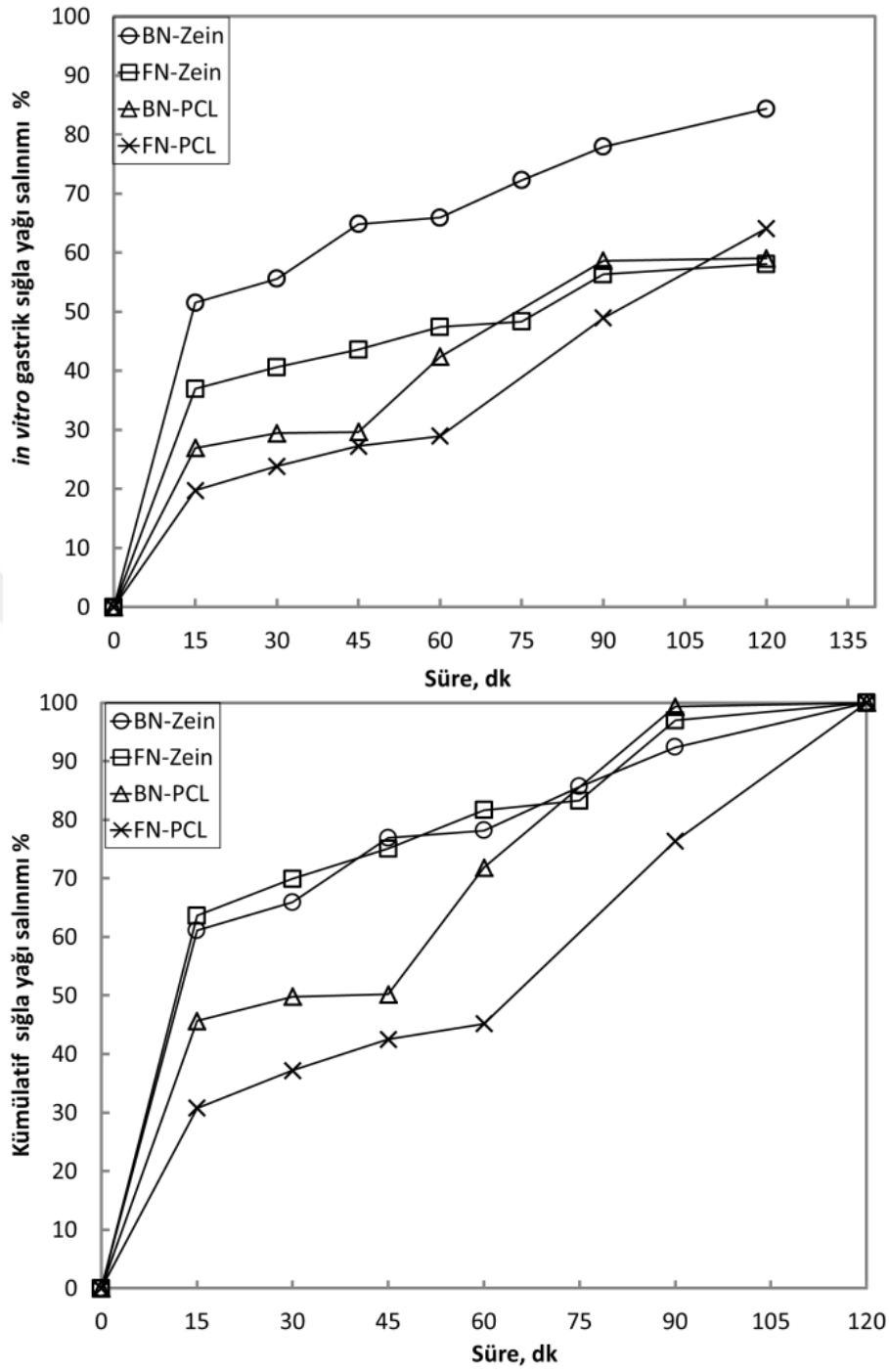
Flaş nanoçöktürme ile üretilen sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin statik *in vitro* sindirim ortamlarındaki sıgla yağı salınım oranları ve trans-sinamik asit miktarları ağız ve mide ortam sıvıları simüle edilerek gerçekleştirilmiştir. PCL-SL1, PCL-SL2 ve PCL-SL3 nanopartiküllerinin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımları sırasıyla %2,88, %5,12 ve %7,11 olarak tespit edilmiştir. Sıgla yağı oranı, nanopartiküllerin *in vitro* ağız sindirim ortamı salınımlarını istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilemektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça, *in vitro* ağız sindirim ortamında salınan sıgla yağı oranının ve tespit edilen trans-sinamik asit miktarının arttığı görülmüştür. PCL-SL1, PCL-SL2 ve PCL-SL3 nanopartiküllerinin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımları sırasıyla %52,13, %64,10 ve %75,00 olarak tespit edilmiştir.

Sığla yağı oranı, nanopartiküllerin *in vitro* mide sindirim ortamı salınımlarını istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) düzeyde etkilemektedir. Sığla yağı oranı arttıkça, *in vitro* mide sindirim ortamında salınan sığla yağı ve trans-sinamik asit miktarının arttığı görülmüştür.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, flaş nanoçöktürme yöntemi ile PCL nanopartikülleri üretiminde, partikül boyutu  $<300$  nm, dar boyut dağılımlı, mutlak değerce yüksek zeta potansiyeline sahip, yüksek enkapsülasyon etkinliğine ve ürün verimine sahip ve *in vitro* sindirim analizinde ağız ortamında düşük mide ortamında yüksek açılım gösteren denemenin PCL-SL3 olduğu görülmüş ve flaş nanoçöktürme yöntemi ile PCL-NP üretiminde optimum üretim olarak seçilmiştir.

#### **4.7. *In vitro* Gastrik Ortamda Sığla Yağı (SL) Salınım Profili**

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri için optimum koşullarında üretilen sığla yağı dolgulu zein ve PCL nanopartiküllerin statik *in vitro* gastrik sindirim ortamında salınım profilleri, 15-30-45-60-75-90 ve 120. dk periyodlarında alınan örnekler üzerinden trans-sinamik asit miktarı üzerinden HPLC yardımı ile incelenmiştir. Şekil 4.12’de optimum nanopartiküllerinin *in vitro* gastrik ortamda zamana bağlı sığla yağı salınım oranları (%) ve kümülatif salınım (%) profillerinin grafikleri sunulmuştur.



**Şekil 4.12.** Optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin *in vitro* gastrik ortamda zamana bağlı sıgla yağı salınım oranları (%) ve kümülatif salınım (%) profilleri.(BN:basit nanoçöktürme yöntemi, FN:flaş nanoçöktürme yöntemi).

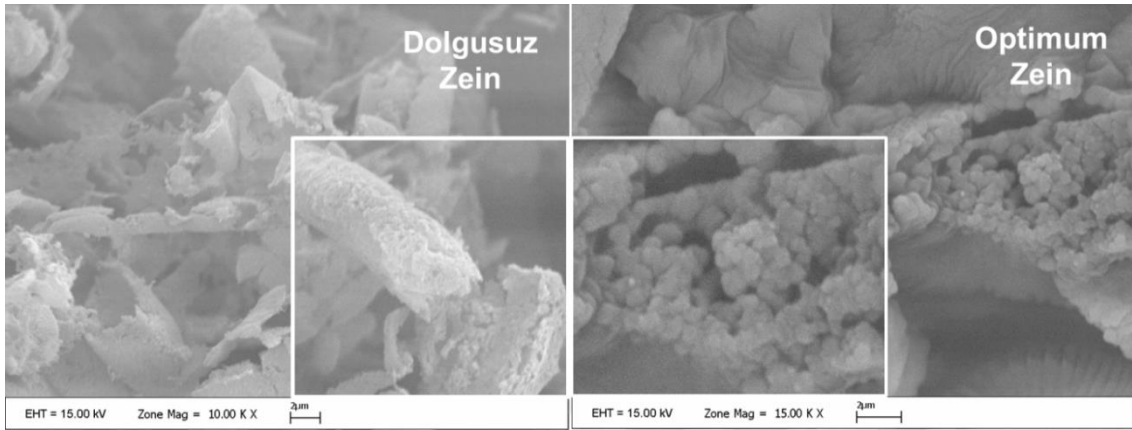
Şekil 4.12’de verilen grafikler incelendiğinde, sıgla yağının patlama salımı (burst release) tüm optimum üretimlerde ilk 15 dk içinde gerçekleşmiş ve salınım oranları üretim metodu ve materyal türüne göre farklılık göstermiştir. Optimum

nanopartiküllerin patlama salınım oranları BN-zein, FN-zein, BN-PCL ve FN-PCL için sırasıyla %51,53, %36,93, %26,94 ve %19,72 olarak tespit edilmiş ve en düşük patlama salınımı FN-PCL nanopartiküllerinde görülmüştür. Salınım profilleri incelendiğinde kaplama materyali olan PCL, zein materyaline göre daha yüksek kapsülleme kararlılığı göstererek daha düşük salınım oranları sergilemiştir. Gastrik sindirim analizi sonunda salınım oranları BN-zein, FN-zein, BN-PCL ve FN-PCL için sırasıyla %84,34, %58,05, %59,03 ve %64,11 olarak tespit edilmiştir. Salınım profilleri incelendiğinde BN-zein örneği mide ortamında en yüksek açılım oranını, FN-zein örneği ise en düşük açılım oranını göstermiştir. Kümülatif salınım sonuçları incelendiğinde, zein materyali üzerinde üretim yönteminin belirgin bir etkisi görülmezken, PCL materyali üzerinde üretim yönteminin oldukça etkili olduğu görülmüştür. Her iki materyalin sığla yağı salınımında kontrollü salınım sağladığı ancak; PCL'nin zein materyaline göre daha uzun süreli salınım (sustained release) özelliği gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak, düşük patlama salınımı ve uzun süreli yavaş salınım özelliği gösteren üretimin optimum nanopartiküllerden FN-PCL olduğu görülmüştür.

#### **4.8. Nanopartikül Morfolojisi**

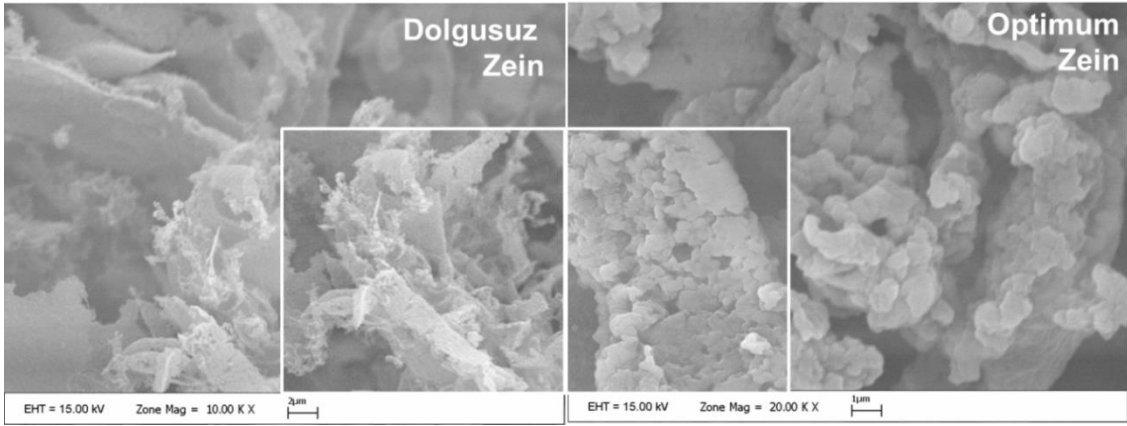
Nanopartiküllerin kararlılıkları ve toksisite özellikleri partikül boyutu, şekli ve yüzeyinden doğrudan etkilenir ve partikül koagülasyonları olumsuz sonuçlar üretebilir (Arshad vd., 2021). Bu nedenle elde edilen nanopartiküller, boyut, şekil, yüzey alanı ve kümelenme özellikleri bakımından morfolojik olarak incelenmelidir. Basit nanoçöktürme yöntemi ile optimum proses koşullarında üretilen sığla yağı dolgulu/dolgusuz zein nanopartikülleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.13'de gösterilmektedir. Zein prolamin protein yapısında olup küresel nanopartiküller oluşturan bir taşıyıcı polimerdir (Podaralla ve Perumal, 2010). Dolgusuz zein nanopartiküllerinin amorf, şekilsiz ve düzensiz forma sahip oldukça küçük (fine particles) boyutlarda oldukları görülmüştür. Düşük boyutlarda nanopartikül kararsızlıklarının yüksek olduğu ve çevresindeki yüksek elektriksel yüklerden dolayı bir araya gelerek kümелendiği bilinmektedir (Abdelwahed vd., 2006). Basit nanoçöktürme yöntemi ile üretilmiş sığla yağı dolgulu optimum zein nanopartiküllerinin (BN-ZNP) ise küresel yapıda olduğu, pürüzsüz, yüzey girinti ve çıkıntısız ve boyut dağılımının homojen olduğu görülmektedir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) kolloidal çözelti içindeki

nanopartikül boyutunu ölçerken, SEM görüntüleri dondurarak kurutulmuş partikül tozlarının partikül boyutlarını yansıtmaktadır. Bu nedenle, DLS ölçümleri ve SEM görüntüleri arasında kurutma işlemine bağlı olarak bir takım boyutsal farklar gözlemlenebilir (Zou vd., 2012). SL-ZNP'nin partikül boyutu dinamik ışık saçılımı (DLS) ile belirlenen partikül boyutları ile uyumlu ve beklendiği gibi dolgusuz zein nanopartiküllerine göre küresel kapsül formunda partiküllerin olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.13.** Basit nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgusuz/dolgulu ZNP'nin SEM görüntüleri.

Flaş nanoçöktürme yöntemi ile optimum proses koşullarında üretilen sığla yağı dolgulu/dolgusuz zein nanopartikülleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.14'de gösterilmektedir. Dolgusuz zein nanopartiküllerinin basit nanoçöktürme yöntemindeki sonuçlara benzer amorf, şekilsiz ve düzensiz forma sahip olduğu görülmüştür. Flaş nanoçöktürme yöntemi ile üretilmiş sığla yağı dolgulu optimum zein nanopartiküllerinin (FN-ZNP) ise pürüzsüz, küresel, yüzey girinti ve çıkıntısız ve homojen boyut dağılımına sahip olduğu görülmektedir. DLS ölçümleri ve SEM görüntüleri birbirleri ile uyumludur. Zein, protein yapısından kaynaklı olarak tek formulu olmayan ancak tek dağılımlı ve birbiri ile iç içe geçmiş nanopartiküller oluşturmuştur (Thankappan vd., 2020). Zein nanopartikül çalışmalarında yaşanan en büyük sorun toplanma eğilimi ve yeniden dağılıbilirlik özellikleridir. Bu sorunu önlemek için, üretim aşamasında stabilizatör kullanılabilir veya partikül yüzeyine yüzey-aktif maddeler kullanılarak kaplama yapılabilir (Raza vd., 2020).

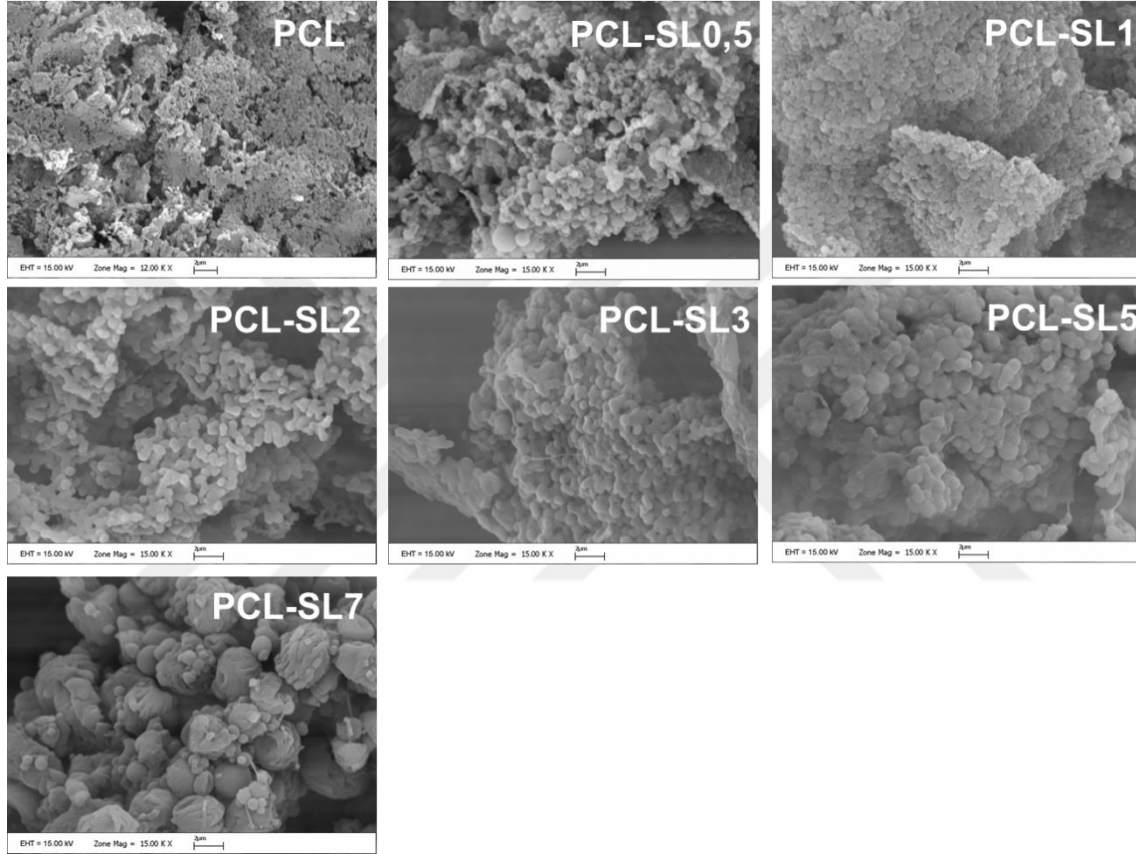


**Şekil 4.14.** Flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgunuz/dolgulu ZNP'nin SEM görüntüleri.

Sentetik polimerler kullanılarak nanopartikül oluşumu, çözelti içinde dağılmış monomerlerin polimerizasyonu veya yeniden biçimlendirilmiş polimerlerin dispersiyonunu içerir. Nanoçöktürme yöntemi yeniden biçimlendirilmiş polimerlerin dispersiyonunu içeren kolay ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (Ephrem vd., 2014). Polikaprolakton,  $\epsilon$ -kaprolakton polimerleşmesi (homopolimer) ile elde edilen düşük molekül ağırlıklı, biyoçözünür, yarı kristal yapıda alifatik bir poliyesterdir (Ramanujam vd., 2018).

Basit nanoçöktürme yöntemiyle dolgunuz ve farklı oranlarda sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.15'de gösterilmektedir. (Ramanujam vd., 2018). Sıgla yağı dolgunuz ve dolgulu nanopartiküllerinin pürüzsüz, kusursuz küresel, yüzey girinti ve çıkıntısız ve boyut dağılımının homojen (uniform) ve tek dağılımlı (monodisperse) olduğu görülmektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça nanopartiküllerin boyutları dinamik ışık saçılımı (DLS) ölçümleri ile uyumlu olarak artmıştır. Bu sonuç, PCL nanopartikülleri içine sıgla yağının başarı ile doldurulduğunu göstermektedir. Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin SEM görüntülerinde homojen ve tek dağılımlı bireysel nanopartiküller optimum olarak seçilen PCL-SL2 örneğinde görülmüştür. Yüksek sıgla yağı oranlarında, PCL-SL5 ve PCL-SL7 örneklerinde görülen partiküllerin dendritik uzantılarla birbirlerine bağlandığı görülmüştür. Bu yapılar, organik solvent faz akışının neden olduğu arayüzey türbülansı ile hızla oluşan partiküllerin diğer partiküllerin etrafını sarması ve bazı bölgelerde yetersiz karışması nedeni ile oluşmuş olabilir (Guo vd., 2023). Öte yandan, sıgla yağı içeriğinde saflaştırma önışleminde kısmen

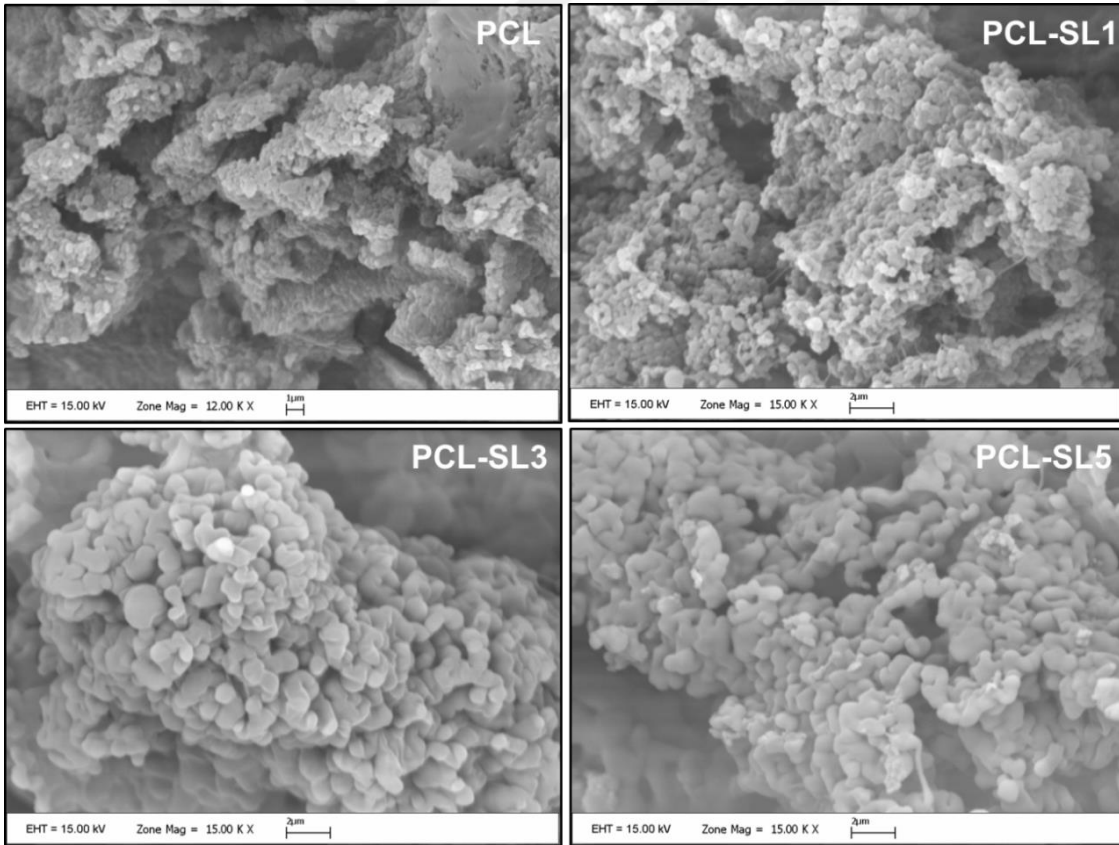
ayrışmayan birtakım reçine benzeri organik moleküllerin partiküller etrafında bu ipliksi yapıları oluşturduğu düşünülebilir. Bu sonuca göre, partikül boyutunun büyümesi, pürüssüz küresel yapının bozulması, agregasyonların oluşması açısından basit nanoçöktürme yöntemiyle PCL nanopartikül üretiminde %5 sıgla yağı oranından daha yüksek değerlerde yükleme yapılamayacağı öngörülmüştür.



**Şekil 4.15.** Basit nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin SEM görüntüleri.

Flaş nanoçöktürme yöntemiyle dolgusuz ve farklı oranlarda sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Sığla yağı dolgusuz/dolgulu nanopartiküllerinin homojen, küresel, pürüzsüz, kusursuz yüzey girinti ve çıkıntısız ve tek boyut dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Sığla yağı oranı arttıkça nanopartiküllerin boyutları dinamik ışık saçılımı (DLS) ölçümleri ile uyumlu olarak artmıştır. Bu sonuç, PCL nanopartikülleri içine sıgla yağı yüklemesinin gerçekleştiğini göstermektedir. Flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin SEM görüntülerinde homojen ve tek dağılımlı bireysel

nanopartiküller optimum olarak seçilen PCL-SL3 örneğinde görülmüştür. Yüksek sıgla yağı oranında, PCL-SL5 örneği nanopartiküllerinde, küresel kapsüllerin dendritik uzantılarla birbirlerine bağlandığı görülmüştür. Bu yapı, flaş akışın neden olduğu türbülanslı karışımın ara yüzeyde hızla oluşan negatif zeta potansiyel değerine sahip partiküllerin diğer partiküllerin etrafını sarması ve bazı bölgelerde yetersiz karışması nedeni ile oluşmuş olabilir (Guo vd., 2023). Öte yandan, sıgla yağı içinde bulunması muhtemel olan reçine benzeri organik moleküllerin partiküller etrafında bu ipliksi yapıları oluşturduğu düşünülebilir. Bu sonuca göre, partikül boyutunun büyümesi, pürüssüz küresel yapının bozulması, agregasyonların oluşması açısından flaş nanoçöktürme yöntemiyle PCL nanopartikül üretiminde %5 sıgla yağı oranından daha yüksek değerlerde yükleme yapılamayacağı öngörülmüştür.

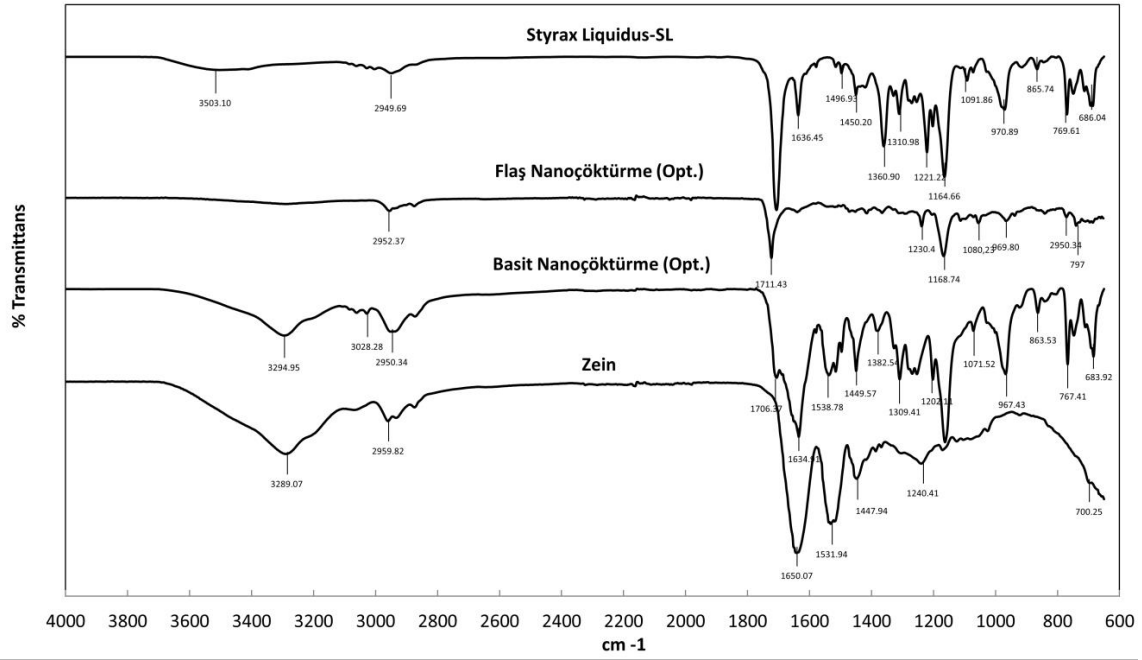


**Şekil 4.16.** Flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL-NP'nin SEM görüntüleri.

#### 4.9. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

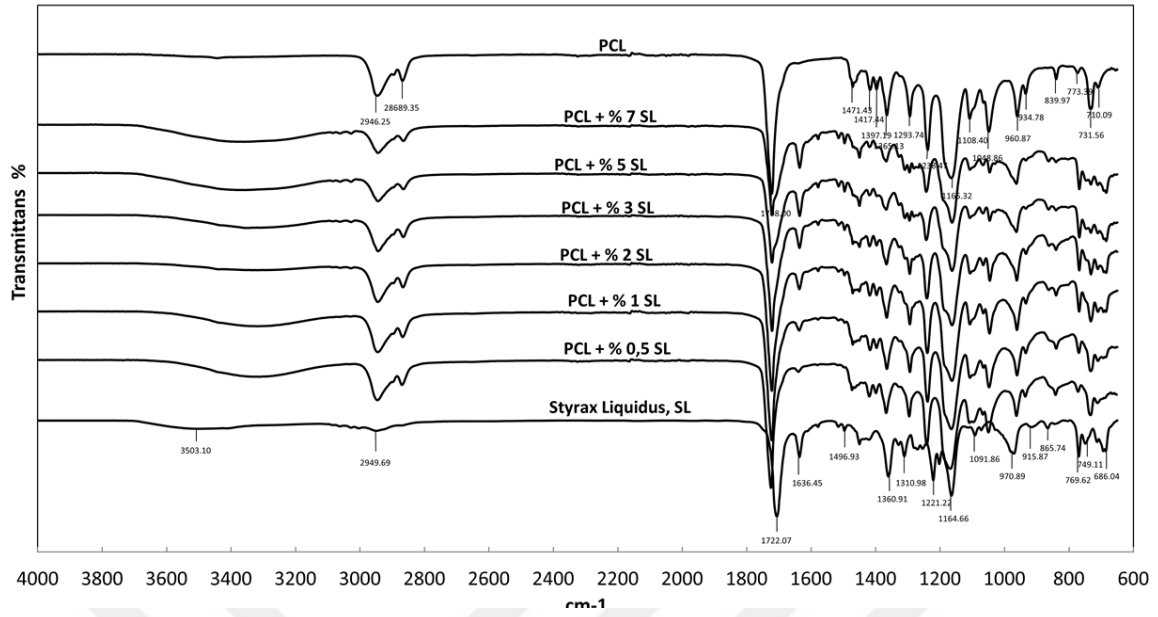
Sığıla yağı dolgulu/dolgunsuz nanopartiküllerin yapısındaki farklı etkileşimlerde bulunan fonksiyonel grupların kimyasal yapıları FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. Araştırmada, sığıla yağı, dolgunsuz zein nanopartikülleri ve basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleriyle üretilen optimum zein nanopartiküllerinin FTIR spektrumları incelenmiş ve paternler Şekil 4.17’de sunulmuştur. Spektrumların 4000 ile 600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında taranan belirgin pikleri gösterilmiştir. Dolgunsuz zein nanopartiküllerinin FTIR spektrumları, sırasıyla 1650 ve 1530  $\text{cm}^{-1}$ ’de tipik amid I ve II pikleri göstermiştir (Tavares vd., 2021). Amid I bandı karbonil C=O gerilme titreşimine karşılık gelirken, amid II bandı hem C-N gerilme titreşiminden hem de C-N-H düzlem içi bükülmeden kaynaklanmaktadır (Zou vd., 2012). Öte yandan sığıla yağı, FTIR spektrumunda 3500, 2950 ve 1636-1100  $\text{cm}^{-1}$ ’deki güçlü absorpsiyon bantları sırasıyla aromatik esterler, karboksilik asitler ve alkoller gibi poliflavanoidlerin C-H gerilme, C=C gerilme ve C-O gerilme titreşimleri ile karakterize edilmektedir (Patle vd., 2020).

Genel olarak, hem dolgunsuz zein hem de sığıla yağının kimyasal yapılarında yer alan fonksiyonel gruplar sığıla yağı dolgulu zein nanopartiküllerinin spektrumlarında da karşımıza çıkmakta ancak etkileşimlerin şiddetlerinde değişimler ve spektrumlarda değişen dalga boylarına ( $\text{cm}^{-1}$ ) karşılık gelen % geçirgenlik değerlerinde farklılıklar oluşturmaktadır.

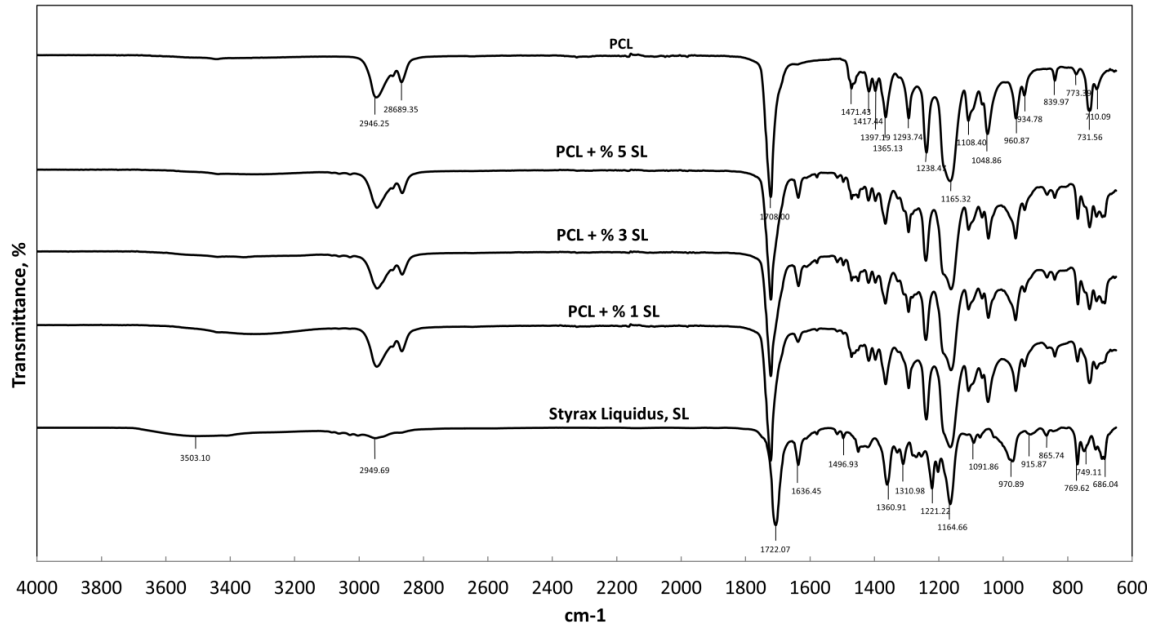


**Şekil 4.17.** Basit ve Flaş nanoçöktürme yöntemi sıgla yağı dolgusuz/dolgulu ZNP'nin FTIR spektrumu.

Sıgla yağı dolgusuz/dolgulu PCL nanopartiküllerinin FTIR spektrumu basit nanoçöktürme yöntemi için Şekil 4.18'de ve flaş nanoçöktürme yöntemi için Şekil 4.19'da sunulmuştur. Dalgusuz PCL için,  $1708\text{ cm}^{-1}$  yakınındaki karbonil gerilme gibi güçlü bandı ve  $2946\text{--}2869$ ,  $1293$ ,  $1238$  and  $1165\text{ cm}^{-1}$  gerilme bantları sırasıyla  $\text{CH}_2$ , C-C, asimetrik COC ve OC-O titreşimlerine karşılık gelmektedir (Sanna vd., 2013). Öte yandan sıgla yağı, FTIR spektrumunda  $3500$ ,  $2950$  ve  $1636\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ 'deki güçlü absorpsiyon bantları sırasıyla aromatik esterler, karboksilik asitler ve alkooller gibi poliflavanoidlerin C-H gerilme, C=C gerilme ve C-O gerilme titreşimleri ile karakterize edilmektedir (Patle vd., 2020). Sıgla yağı dolgulu PCL nanopartiküllerinin dolgusuz PCL ve sıgla yağı kimyasal titreşimlerine karşılık gelen örtüşen sinyaller içermesi üretilen nanopartiküllerin bileşimini desteklemektedir. Sıgla yağı oranı arttıkça, PCL titreşim bantlarının dalga boylarına ( $\text{cm}^{-1}$ ) karşılık gelen % geçirgenlik değerlerinde azalma görülürken, sıgla yağının spektrumuna karşılık gelen titreşim bantlarının % geçirgenlik değerlerinde artış gözlenmiştir.



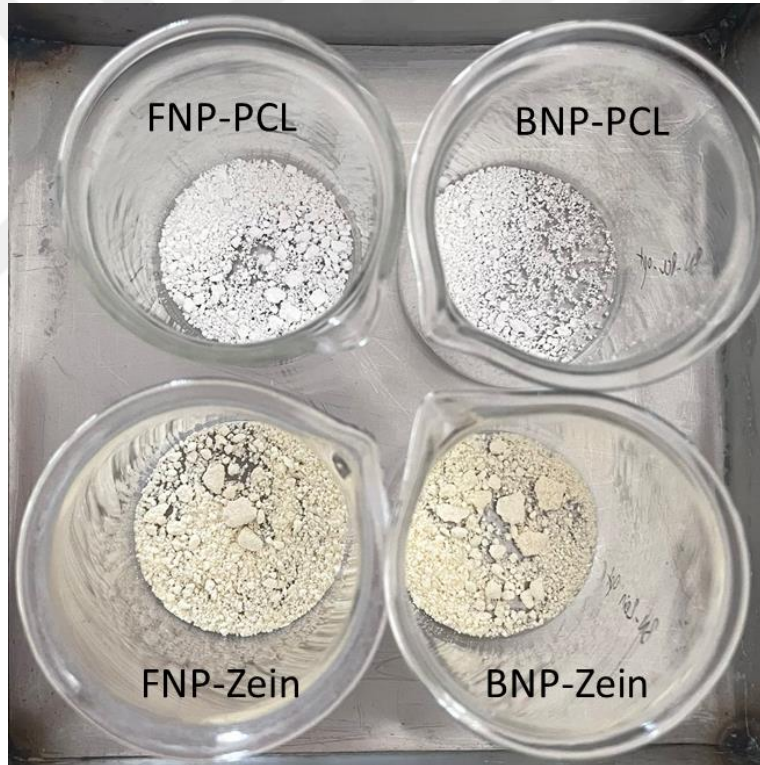
**Şekil 4.18.** Basit nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgunsuz/dolgulu PCL nanopartiküllerinin FTIR spektrumu.



**Şekil 4.19.** Flaş nanoçöktürme yöntemi sığla yağı dolgunsuz/dolgulu PCL nanopartiküllerinin FTIR spektrumu.

#### 4.10. Fiziksel Analiz Sonuçları

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri için optimum üretim koşullarında elde edilen zein ve PCL nanopartikül tozlarının (Resim 4.4) fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için; renk, nem içeriği, su aktivitesi, yığın ve sıkıştırılmış yoğunluk, akabilirlik ve çözünürlük analizleri uygulanmıştır. Resim 4.4’de, basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum PCL nanopartikülleri BNP-PCL ve flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum PCL nanopartikülleri FNP-PCL, basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum zein nanopartikülleri BNP-Zein ve flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum zein nanopartikülleri FNP-Zein, olarak kodlanmıştır.



**Resim 4.4.** Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile sıgla yağı dolgu optimum zein ve PCL nanopartikül tozlarının görünümü.

Basit ve flaş nanoçöktürme üretim yöntemleri ile zein ve PCL kaplama materyallerinin nanopartiküllerin fiziksel özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen analizlerin her biri istatistiksel açıdan incelenmiştir. Optimum nanopartikül tozların fiziksel analiz sonuçları Çizelge 4.35’de verilen tabloda

özetlenmiştir. Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum zein nanopartikülleri BN-ZNP, flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum zein nanopartikülleri FN-ZNP, Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum PCL nanopartikülleri BN-PCL-NP ve flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum PCL nanopartikülleri FN-PCL-NP olarak kodlanmıştır.

**Çizelge 4.35.** Sığla yağı ve basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile elde edilen optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin fiziksel analiz sonuçları.

| Fiziksel Özellikler                                          | BN-ZNP      | FN-ZNP      | BN- PCL -NP | FN- PCL -NP |
|--------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| L*                                                           | 87,84±0,66  | 86,75±1,81  | 91,68±1,09  | 93,07±0,28  |
| a*                                                           | -1,21±0,09  | -0,94±0,02  | -0,82±0,06  | -0,92±0,03  |
| b*                                                           | 18,18±0,29  | 15,31±1,37  | 4,38±0,09   | 3,56±0,05   |
| Chroma                                                       | 18,22±0,29  | 17,41±1,16  | 4,46±0,09   | 3,68±0,05   |
| Hue                                                          | 93,79±0,28  | 93,27±0,13  | 100,5±0,55  | 104,5±0,34  |
| Nem içeriği (%)                                              | 7,00±0,62   | 8,78±1,37   | 7,97±0,04   | 7,38±1,42   |
| Su aktivitesi (a <sub>w</sub> )                              | 0,462±0,004 | 0,396±0,019 | 0,385±0,013 | 0,372±0,012 |
| Yığın yoğunluk (ρ <sub>b</sub> , kg/m <sup>3</sup> )         | 118±0,002   | 71±0,011    | 85±0,004    | 82±0,006    |
| Sıkıştırılmış yoğunluk (ρ <sub>t</sub> , kg/m <sup>3</sup> ) | 158±0,015   | 113±0,018   | 117±0,004   | 121±0,008   |
| Akabilirlik (Carr İndeks)                                    | 25,00±5,40  | 37,50±0,00  | 27,02±2,85  | 32,34±1,47  |
| Çözünürlük (%)                                               | 8,13±1,59   | 5,76±1,17   | 14,02±2,36  | 9,95±1,27   |

Nanopartikül tozlarının duyuşal çekiciliği ve kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla renk özellikleri, L\* parlaklık (lightness); a\* kırmızılık/yeşillik; b\* sarılık/mavilik; Chroma renk doygunluğu ve Hue renk tonu açısı ölçütleri ile incelenmiştir. L\* değeri, 0=siyah ve 100=beyaz renge karşılık gelir; a\* değeri, +a\*=kırmızı ve -a\*=yeşil rengi belirtir; b\* değeri, +b\*=sarı ve -b\*=mavi rengi belirtir. Sığla yağı kaplama materyallerinin renkleri zein için sarı PCL için beyaza yakın renkte olduğu için nanopartikül tozlarının renklerinin kaplama materyali rengine yakın olması beklenmektedir. Sığla yağı rengine yakın koyu gri-kahve rengi tozlar iyi kaplama yapılmadığının bir göstegesidir. Çizelge 4.35’de renk değerleri incelendiğinde, zein örneklerinin L\* değerleri 86,75 ile 87,84 arasında, a\* değerleri -0,94 ile -1,21 arasında, b\* değerleri 15,31 ile 18,18 arasında, Chroma değerleri 17,41 ile 18,22 arasında ve Hue değerleri ise 93,27 ile 93,79 arasında değişiklik göstermiştir. Bu değerler incelendiğinde, zein nanopartiküllerinin L\* değeri yüksek ve kaplama materyali rengine yakın açık, hafif sarı ve doymuş renge sahip olduğu görülmektedir. PCL örneklerinin L\* değerleri 93,07 ile 91,68 arasında, a\* değerleri -0,82 ile -0,92 arasında, b\* değerleri 3,56 ile 4,38 arasında, Chroma değerleri 3,68 ile 4,46 arasında ve Hue değerleri ise 100,5 ile

104,5 arasında değişiklik göstermiştir. Bu değerler incelendiğinde, PCL nanopartiküllerinin L\* değeri oldukça yüksek ve kaplama materyali rengine yakın açık, beyaz ve doğgun renge sahip olduğu görölmektedir. Nanopartiküllerin renk özellikleri incelendiğinde, materyal türünün tüm değerler üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi olduğu görülürken, b\* ve Hue değerleri üzerine yöntem türünün de istatistiksel olarak önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.37).

**Çizelge 4.36.** L\*, a\* , b\*, Chroma ve Hue değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

|                 | L*                       |                          | a*                       |                           | b*                       |                         |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                 | BN                       | FN                       | BN                       | FN                        | BN                       | FN                      |
| <b>Yöntem</b>   | 89,76 <sup>a</sup> ±0,92 | 89,91 <sup>a</sup> 1,49  | -1,01 <sup>a</sup> ±0,09 | -0,93 <sup>a</sup> ±0,01  | 11,28 <sup>a</sup> ±3,08 | 9,43 <sup>b</sup> ±2,65 |
|                 | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                       | ZEİN                     | PCL                     |
| <b>Materyal</b> | 87,29 <sup>b</sup> ±0,55 | 92,37 <sup>a</sup> ±0,43 | -1,07 <sup>b</sup> ±0,06 | -0,87 <sup>a</sup> ±0,02  | 16,43 <sup>a</sup> ±0,74 | 3,79 <sup>b</sup> ±0,18 |
|                 | Chroma                   |                          | Hue                      |                           |                          |                         |
|                 | BN                       | FN                       | BN                       | FN                        |                          |                         |
| <b>Yöntem</b>   | 11,34 <sup>a</sup> ±3,08 | 10,55 <sup>a</sup> ±3,09 | 97,18 <sup>b</sup> ±1,52 | 98,90 <sup>a</sup> ±2,52  |                          |                         |
|                 | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                       |                          |                         |
| <b>Materyal</b> | 17,82 <sup>a</sup> ±0,36 | 4,07 <sup>b</sup> ±0,18  | 93,54 <sup>b</sup> ±0,14 | 102,55 <sup>a</sup> ±0,90 |                          |                         |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.37.** L\*, a\* , b\*, Chroma ve Hue değerlerinin değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

|                        | L* |             |            | a*          |            | b*         |           |
|------------------------|----|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----------|
|                        | SD | KO          | F          | KO          | F          | KO         | F         |
| <b>Yöntem</b>          | 1  | 0,06900833  | 0,06       | 0,01840833  | 5,74       | 10,2120750 | 20,67**   |
| <b>Materyal</b>        | 1  | 77,36840833 | 62,15**    | 0,12607500  | 39,30***   | 489,346408 | 990,5***  |
| <b>Yöntem*Materyal</b> | 1  | 4,62520833  | 3,72       | 0,10267500  | 32,00***   | 3,1724083  | 6,42*     |
| <b>Hata</b>            | 8  | 1,24480000  |            | 0,00320833  |            |            | 0,4940167 |
|                        | C* |             |            | h           |            |            |           |
|                        | SD | KO          | F          | KO          | F          |            |           |
| <b>Yöntem</b>          | 1  | 1,8802083   | 5,23       | 8,8408333   | 68,41***   |            |           |
| <b>Materyal</b>        | 1  | 567,0500083 | 1576,60*** | 244,0812000 | 1888,56*** |            |           |
| <b>Yöntem*Materyal</b> | 1  | 0,0006750   | 0,00       | 15,0528000  | 116,47***  |            |           |
| <b>Hata</b>            | 8  | 0,3596667   |            | 0,1292417   |            |            |           |

\*p<0,05 ,\*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001

Optimum nanopartikül tozlarının nem içeriği ve su aktivitesi özellikleri, partikül stabilitesini ve akabilirlik özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Dondurarak kurutma yapılarak üretilen optimum zein nanopartikül tozları nem içerikleri %7,00 ile %8,78

aralığında ve su aktivitesi değerleri 0,39 ile 0,46 aralığında değişim gösterirken; PCL nanopartikül tozları nem içerikleri %7,38 ile %7,97 aralığında ve su aktivitesi değerleri 0,37 ile 0,38 aralığında değişim göstermiştir. Nanopartiküllerin nem özellikleri üzerine materyal ve yöntem çeşidi açısından istatistiksel olarak önemli bir etki görülmezken su aktivitesi değerleri üzerine materyal türünün istatistiksel olarak önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.39). PCL nanopartikülleri, zein nanopartiküllerinden daha düşük nem içeriğine ve su aktivitesi değerlerine sahip bulunmuştur (Çizelge 4.38).

**Çizelge 4.38.** Nem ve su aktivitesi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

| Yöntem   | Nem (%)                 |                         | Su aktivitesi ( $a_w$ )  |                          |
|----------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|          | BN                      | FN                      | BN                       | FN                       |
|          | 7,49 <sup>a</sup> ±0,33 | 8,08 <sup>a</sup> ±0,69 | 0,425 <sup>a</sup> ±0,03 | 0,385 <sup>a</sup> ±0,01 |
| Materyal | ZEİN                    | PCL                     | ZEİN                     | PCL                      |
|          | 7,89 <sup>a</sup> ±0,67 | 7,67 <sup>a</sup> ±0,44 | 0,433 <sup>a</sup> ±0,02 | 0,378 <sup>a</sup> ±0,01 |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların  $p < 0,05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.39.** Nem ve su aktivitesi değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

|                 | Nem (%) |            |      | Su aktivitesi ( $a_w$ ) |        |
|-----------------|---------|------------|------|-------------------------|--------|
|                 | SD      | KO         | F    | KO                      | F      |
| Yöntem          | 1       | 0,70805000 | 0,66 | 0,00320000              | 6,10   |
| Materyal        | 1       | 0,09245000 | 0,09 | 0,00605000              | 11,52* |
| Yöntem*Materyal | 1       | 2,78480000 | 2,60 | 0,00125000              | 2,38   |
| Hata            | 4       | 1,07052500 |      | 0,00052500              |        |

Toz ürünlerin taşıma, işleme ve depolama kalitesi akabilirlik, sıkıştırılabilirlik ve yığın yoğunluk gibi fiziksel özelliklere bağlıdır (Jallo vd., 2012). Yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk değerleri arasındaki fark toz partiküllerinin aralarındaki van der Waals etkileşimleri, toz adhezyon/kohesyon kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler, partikül yüzey alanı ve partikül boyutu özellikleri ile doğrudan ilişkilidir (Mullarney vd., 2011). Genellikle, 30  $\mu\text{m}$  partikül boyutu altındaki tozların taşıma ve işleme süreçleri, aralarındaki güçlü etkileşimlerden dolayı zordur. Bu etkileşimleri ve agregasyonları önlemek için, nanopartiküllerin yüzeyi kuru kaplama ile modifiye edilmektedir (Jallo vd., 2012). Nanopartikül tozlarının partikül yoğunlukları incelendiğinde, zein nanopartiküllerinin yığın yoğunluk değerleri 71 ile 118  $\text{kg/m}^3$  arasında değişirken, sıkıştırılmış yoğunluk değerleri 113 ile 158  $\text{kg/m}^3$  arasında değişmektedir. PCL

nanopartiküllerinin yığın yoğunluk değerleri 82 ile 85 kg/m<sup>3</sup> arasında değişirken, sıkıştırılmış yoğunluk değerleri 117 ile 121 kg/m<sup>3</sup> arasında değişmektedir. Toz ürünlerin yığın yoğunluğunun düşük olması hava boşluğu içeriğinin fazla olduğu anlamına gelir ki bu akabilirliği zorlaştırabilir ve depolama sürecinde oksidasyonla sonuçlanabilir. Nanopartiküllerin yığın yoğunluk değerleri üzerine materyal çeşidinin istatistiksel olarak önemli bir etkisi görülürken sıkıştırılmış yoğunluk değerleri üzerine yöntem ve materyal türünün istatistiksel olarak etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.41).

Carr (1965) toz ürünlerin akabilirlik durumunu yığın yoğunluk ve sıkıştırılmış yoğunluk özelliklerini kullanarak belirlediği Carr İndeks (CI) değerine göre belirlemiştir. Buna göre, CI<15 olduğu durumda akabilirlik çok iyi, CI=15-20 arasında akabilirlik iyi, CI=20-35 arasında akabilirlik zayıf CI=35-45 arasında akabilirlik kötü ve CI>45 olduğu durumda akabilirlik çok kötü olarak tanımlanmıştır. Optimum nanopartikül tozlarının akabilirlik değerleri incelendiğinde zein nanopartiküllerinin CI değerleri 25,00 ile 37,5 aralığında; PCL nanopartiküllerinin CI değerleri 27,02 ile 32,34 aralığında hesaplanmıştır. Optimum nanopartikül tozlarının hepsinin zayıf akabilirlik özelliği gösterdiği ve üretim yöntemi türünden istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilendiği belirlenmiştir (Çizelge 4.41).

Optimum nanopartikül tozlarının suda çözünürlük özellikleri incelendiğinde zein nanopartikülleri %5,76 ile %8,13 aralığında çözünürken, PCL nanopartiküllerinin %9,95 ile %14,02 aralığında çözündüğü görülmüştür. Nanopartiküllerin çözünürlük özellikleri üzerine yöntem ve materyal türünün her ikisinin de istatistiksel olarak önemli etkisi olduğu görülmüştür (Çizelge 4.41).

**Çizelge 4.40.** Yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve Carr Index değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

| Yöntem   | Yığın yoğunluk ( $\rho_b$ , kg/m <sup>3</sup> ) |                          | Sıkıştırılmış yoğunluk ( $\rho_t$ , kg/m <sup>3</sup> ) |                          |
|----------|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|
|          | BN                                              | FN                       | BN                                                      | FN                       |
| Materyal | 102 <sup>a</sup> ±0,01                          | 76 <sup>b</sup> ±0,00    | 138 <sup>a</sup> ±0,01                                  | 117 <sup>a</sup> ±0,01   |
|          | ZEİN                                            | PCL                      | ZEİN                                                    | PCL                      |
|          | 95 <sup>a</sup> ±0,01                           | 84 <sup>a</sup> ±0,00    | 136 <sup>a</sup> ±0,02                                  | 119 <sup>a</sup> ±0,00   |
| Yöntem   | Carr Index                                      |                          | Çözünürlük (%)                                          |                          |
|          | BN                                              | FN                       | BN                                                      | FN                       |
| Materyal | 25,88 <sup>a</sup> ±1,88                        | 34,89 <sup>a</sup> ±1,56 | 11,07 <sup>a</sup> ±1,88                                | 7,86 <sup>a</sup> ±1,30  |
|          | ZEİN                                            | PCL                      | ZEİN                                                    | PCL                      |
|          | 31,13 <sup>a</sup> ±3,99                        | 29,65 <sup>a</sup> ±1,78 | 6,95 <sup>a</sup> ±0,89                                 | 11,98 <sup>a</sup> ±1,41 |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.41.** Yığın yoğunluk, sıkıştırılmış yoğunluk ve Carr Index değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

|                        | Yığın yoğunluk (kg/m <sup>3</sup> ) |             |         | Sıkıştırılmış yoğunluk (kg/m <sup>3</sup> ) |        |
|------------------------|-------------------------------------|-------------|---------|---------------------------------------------|--------|
|                        | SD                                  | KO          | F       | KO                                          | F      |
| <b>Yöntem</b>          | 1                                   | 0,00132612  | 30,23** | 0,0008405                                   | 5,35   |
| <b>Materyal</b>        | 1                                   | 0,00023112  | 5,27    | 0,0005445                                   | 3,47   |
| <b>Yöntem*Materyal</b> | 1                                   | 0,00099013  | 22,57** | 0,0012005                                   | 0,0506 |
| <b>Hata</b>            | 4                                   | 0,00004388  |         | 0,0001570                                   |        |
|                        | Carr Index                          |             |         | Çözünürlük                                  |        |
|                        | SD                                  | KO          | F       | KO                                          | F      |
| <b>Yöntem</b>          | 1                                   | 162,4503125 | 16,46*  | 20,6403125                                  | 7,42   |
| <b>Materyal</b>        | 1                                   | 4,3365125   | 0,44    | 50,7528125                                  | 18,25  |
| <b>Yöntem*Materyal</b> | 1                                   | 27,9378125  | 2,83    | 1,4878125                                   | 0,54*  |
| <b>Hata</b>            | 4                                   | 9,8671125   |         | 2,7809375                                   |        |

\*p<0,05 , \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001

#### 4.11. Kimyasal Analiz Sonuçları

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri için optimum üretim koşullarında elde edilen zein ve PCL nanopartikül tozlarının kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için; toplam fenolik madde miktarı, antioksidan kapasiteleri ve trans-sinamik asit bileşen miktarı belirleme analizleri uygulanmıştır. Basit/flaş nanoçöktürme üretim yöntemleri ve zein/PCL kaplama materyallerinin nanopartiküllerin kimyasal özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen analizlerin her biri istatistiksel açıdan incelenmiştir. Sığla yağının ve optimum nanopartikül tozların kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.42’de verilen tabloda özetlenmiştir. Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum zein nanopartikülleri BN-ZNP, flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum zein nanopartikülleri FN-ZNP, Basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum PCL nanopartikülleri BN-PCL-NP ve flai nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen optimum PCL nanopartikülleri FN-PCL-NP olarak kodlanmıştır.

**Çizelge 4.42.** Sığıla yağı ve optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin kimyasal analiz sonuçları.

| Örnekler                    | TFM<br>(mg GAE/g KM) | DPPH<br>(mg TE /g KM) | ABTS<br>(mg TE /ml) | TSA miktarı<br>(mg/g KM) |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>Sığıla Yağı (mg/ml )</b> | 26,40±0,07           | 7,07±2,29             | 0,27±0,01           | 22,33                    |
| Ağız ortamı                 |                      |                       |                     | 18,02                    |
| Mide ortamı                 |                      |                       |                     | 16,71                    |
| Bağırsak ortamı             |                      |                       |                     | 20,63                    |
| <b>BN-ZNP</b>               | 2,388±0,06           | 0,864±0,003           | 0,14±0,003          | 2,074±0,18               |
| Ağız ortamı                 | 0,868±0,02           | 0,410±0,01            |                     | 0,529±0,03               |
| Mide ortamı                 | 1,184±0,01           | 0,749±0,02            |                     | 1,592±0,05               |
| Bağırsak ortamı             | 1,598±0,21           | 0,698±0,03            |                     | 1,363±0,02               |
| <b>FN-ZNP</b>               | 1,839±0,25           | 0,910±0,004           | 0,21±0,003          | 1,075±0,07               |
| Ağız ortamı                 | 1,281±0,24           | 0,323±0,01            |                     | 0,344±0,01               |
| Mide ortamı                 | 1,209±0,26           | 0,636±0,02            |                     | 1,065±0,07               |
| Bağırsak ortamı             | 1,594±0,05           | 0,627±0,001           |                     | 0,441±0,00               |
| <b>BN-PCL-NP</b>            | 1,599±0,01           | 0,873±0,015           | 0,35±0,01           | 1,833±0,00               |
| Ağız ortamı                 | 0,649±0,02           | 0,354±0,01            |                     | 0,461±0,00               |
| Mide ortamı                 | 1,158±0,16           | 0,728±0,02            |                     | 1,066±0,00               |
| Bağırsak ortamı             | 1,569±0,06           | 0,442±0,01            |                     | 0,875±0,14               |
| <b>FN-PCL-NP</b>            | 1,693±0,05           | 0,883±0,004           | 0,39±0,005          | 1,405±0,07               |
| Ağız ortamı                 | 0,991±0,04           | 0,303±0,01            |                     | 0,997±0,12               |
| Mide ortamı                 | 1,051±0,18           | 0,622±0,04            |                     | 1,157±0,013              |
| Bağırsak ortamı             | 1,438±0,24           | 0,625±0,003           |                     | 0,902±0,02               |
| <b>Saf Zein</b>             | 0,18±0,05            | 0,16±0,02             |                     |                          |
| <b>Saf PCL</b>              | 0,10±0,04            | 0,09±0,03             |                     |                          |

Saflaştırma önişleminden geçirilmiş sığıla yağının toplam fenolik madde (TFM) miktarı 26,40 mg GAE/ml, antioksidan aktivitesi 7,07 mg TE/ml (DPPH) ve 0,27 mg TE/ml (ABTS+) ve içeriğindeki trans-sinamik asit (TSA) miktarı 22,33 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara sığıla yağı ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 96.34 mg GAE/g olarak tespit edilmiş; antioksidan analiz sonuçlarında ise 80.34 µg/mL (DPPH) ve 51.20 µg/mL (ABTS+) antioksidan aktivite sergilediğini ortaya konmuştur (Ulusoy vd., 2021). Öte yandan, sığıla yapraklarının etanolik ekstraktının antioksidan aktivitesi (DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi) IC<sub>50</sub> değeri 3.11±0.024 mg/mL olarak belirlenmiştir (Saraç ve Şen, 2014). Biyoaktif maddeler olarak fenolik bileşikler antioksidan özelliklere sahip olduklarından, sığıla yağından elde edilen ekstrakt, yağ veya reçine gibi maddelerde görülen toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitedeki farklılıklar toplam sekonder metabolit içeriklerindeki farklılıklardan kaynaklı olabilir.

Optimum nanopartikül tozlarının toplam fenolik madde (TFM) miktarları zein nanopartikülleri için 1,84 ile 2,38 mg GAE/g KM aralığında değişirken, PCL nanopartikülleri için 1,59 ile 1,69 mg GAE/g KM aralığında tespit edilmiştir.

Nanopartikül tozlarının TFM değerleri, içeriklerindeki sıgla yağı oranı ile ilişkili olarak zein nanopartiküllerinde PCL nanopartiküllerine göre daha fazla tespit edilmiştir. Nanopartikül tozlarının toplam fenolik madde değerleri üzerine materyal çeşidinin istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.44). Kaplama materyali olarak seçilen dolgusuz zein ve PCL materyallerinin TFM miktarları sırasıyla 0,18 ve 0,10 mg GEA/g KM olarak bulunmuştur.

Sıgla yağı yüklü optimum nanopartikül tozları DPPH serbest radikallerini inhibe eden antioksidan özellik göstermiştir. Optimum nanopartiküllerin antioksidan kapasitesi değerleri zein nanopartikülleri için 0,86 ile 0,91 mg TE/g KM aralığında değişirken, PCL nanopartikülleri için 0,87 ile 0,88 mg TE/g KM aralığında tespit edilmiştir. Optimum nanopartikül tozlarının antioksidan kapasiteleri zein ve PCL nanopartiküllerinde birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir. Nanopartikül tozlarının antioksidan kapasite değerleri üzerine yöntem çeşidinin istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.44). Kaplama materyali olarak seçilen dolgusuz zein ve PCL materyallerinin antioksidan kapasiteleri sırasıyla 0,16 ve 0,09 mg TE /g KM olarak bulunmuştur.

Optimum nanopartikül tozlarının içeriğindeki trans-sinamik asit (TSA) miktarı incelenmiş ve zein nanopartikülleri için 2,07 ile 1,07 mg/g KM aralığında tespit edilirken, PCL nanopartikülleri için 1,83 ile 1,41 mg mg/g KM aralığında tespit edilmiştir. Farklı formülasyonlara sahip optimum nanopartikül tozlarının TSA miktarları üretim yöntemine bağlı kayıplar içerebilir. Optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin TSA miktarları birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir. Nanopartikül tozlarının TSA miktarları üzerine yöntem çeşidinin istatistiksel olarak önemli bir etkisi olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.44).

ABTS<sup>+</sup> serbest radikal süpürme ile antioksidan kapasite belirleme analizinde, saflaştırma önışleminden geçirilmiş sıgla yağının IC<sub>50</sub> değeri 0,27 mg/ml, olarak tespit edilmiştir. Optimum nanopartikül tozlarının ABTS<sup>+</sup> serbest radikal süpürme miktarları için IC<sub>50</sub> değerleri basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri için sırasıyla zein nanopartiküllerinde 0,14 ile 0,21 mg/ml aralığında değişirken, PCL nanopartiküllerinde ise 0,35 ile 0,39 mg/ml aralığında tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.43.** Optimum nanopartiküllerin toplam fenolik madde (TFM), antioksidan ve trans-sinamik asit (TSA) değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

| Yöntem   | TFM<br>(mg GAE/g KM)    |                         | DPPH<br>(mg TE /g KM)     |                           | TSA<br>(mg/g KM)        |                         |
|----------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
|          | BN                      | FN                      | BN                        | FN                        | BN                      | FN                      |
|          | 1,99 <sup>a</sup> ±0,23 | 1,77 <sup>a</sup> ±0,08 | 0,868 <sup>b</sup> ±0,005 | 0,897 <sup>a</sup> ±0,007 | 1,89 <sup>a</sup> ±0,06 | 1,15 <sup>a</sup> ±0,08 |
| Materyal | ZEİN                    | PCL                     | ZEİN                      | PCL                       | ZEİN                    | PCL                     |
|          | 2,11 <sup>a</sup> ±0,17 | 1,64 <sup>b</sup> ±0,03 | 0,888 <sup>a</sup> ±0,01  | 0,878 <sup>a</sup> ±0,005 | 1,47 <sup>a</sup> ±0,18 | 1,62 <sup>a</sup> ±0,13 |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların  $p<0,05$  seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.44.** Optimum nanopartiküllerin Toplam fenolik madde (TFM), antioksidan ve trans-sinamik asit (TSA) değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

|                 | TFM<br>(mg GAE/g KM) |            |         | DPPH<br>(mg TE /g KM) |         | TSA<br>(mg/g KM) |           |
|-----------------|----------------------|------------|---------|-----------------------|---------|------------------|-----------|
|                 | SD                   | KO         | F       | KO                    | F       | KO               | F         |
| Yöntem          | 1                    | 0,10328513 | 5,81    | 0,00165313            | 25,00** | 1,63676486       | 110,80*** |
| Materyal        | 1                    | 0,43758013 | 24,61** | 0,00019013            | 2,88    | 0,05899318       | 3,99      |
| Yöntem*Materyal | 1                    | 0,20704613 | 11,64*  | 0,00066613            | 10,07*  | 0,14447716       | 9,78*     |
| Hata            | 4                    | 0,01778312 |         | 0,00006613            |         | 0,01477187       |           |

\* $p<0,05$  , \*\* $p<0,01$  ve \*\*\* $p<0,001$

Yüksek oranda hidrofobik biyoaktif maddeler içeren sıgla yağı, genellikle çözünür hale geldikten sonra gastrointestinal sıvılarda mukus tabakasından geçerek epitel hücreler tarafından emilir (Yao vd., 2018). Çalışmada sıgla yağının *in vitro* biyoerişilebilirliği ve optimum nanopartiküllerin gastrointestinal emilim potansiyeli statik *in vitro* ağız, mide ve bağırsak sindirim simülasyon ortamlarından geçirilerek bu ortamlarda salınan sıgla yağı konsantrasyonları ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Optimum zein ve PCL nanopartikülleri farklı formülasyonlara sahip olmalarından dolayı gastrointestinal ortamlardaki davranışlarında da kayda değer farklılıklar bulunmaktadır. *In vitro* sindirim ortamlarında tespit edilen TFM miktarları, antioksidan kapasiteleri ve TSA miktarları Çizelge 4.42’de verilmiştir. Genel olarak, TFM miktarları, antioksidan kapasiteleri ve TSA miktarları ağız ortamında en düşük olarak tespit edilirken, mide ve bağırsak ortamlarında kayda değer ölçüde artmış ve birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir. Bu sonuç, çözünen sıgla yağının gastrik ve bağırsak sindirim ortamlarında bulunan safra tuzu ve peptitlerin varlığı ile miseller ve kompleks yapılar oluşturmuş olmalarından kaynaklanmış olabilir (Yao vd., 2018). Öte yandan,

optimum nanopartikül tozlarının sindirim simülasyon ortamlarındaki salınım yüzdeleri ile TFM miktarları, antioksidan kapasiteleri ve TSA miktarları değerleri birbirleri ile uyumlu korelasyon göstermiştir. Genel olarak, TFM miktarları ağız ortamında en düşük olarak tespit edilirken, mide ve bağırsak ortamlarında kayda değer ölçüde artmış ve birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir (Çizelge 4.45). Ağız ortamında tespit edilen TFM miktarı yöntem ve materyal çeşidinin her ikisinden de istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmektedir (Çizelge 4.46).

**Çizelge 4.45.** Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

| TFM miktarı (mg GAE/g KM) |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Yöntem                    | Ağız ortamı              |                          | Mide ortamı              |                          | Bağırsak ortamı          |                          |
|                           | BN                       | FN                       | BN                       | FN                       | BN                       | FN                       |
| Materyal                  | 1,075 <sup>a</sup> ±0,14 | 0,820 <sup>a</sup> ±0,10 | 1,171 <sup>a</sup> ±0,05 | 1,130 <sup>a</sup> ±0,10 | 1,584 <sup>a</sup> ±0,06 | 1,516 <sup>a</sup> ±0,10 |
|                           | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                      |
|                           | 0,759 <sup>a</sup> ±0,06 | 1,136 <sup>a</sup> ±0,11 | 1,197 <sup>a</sup> ±0,07 | 1,105 <sup>a</sup> ±0,07 | 1,596 <sup>a</sup> ±0,06 | 1,503 <sup>a</sup> ±0,08 |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.46.** Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TFM miktarı değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

| TFM miktarı (mg GAE/g KM) |             |            |        |             |      |                 |      |
|---------------------------|-------------|------------|--------|-------------|------|-----------------|------|
|                           | Ağız ortamı |            |        | Mide ortamı |      | Bağırsak ortamı |      |
|                           | SD          | KO         | F      | KO          | F    | KO              | F    |
| Yöntem                    | 1           | 0,28501250 | 18,42* | 0,00340312  | 0,11 | 0,00918012      | 0,34 |
| Materyal                  | 1           | 0,12954050 | 8,37*  | 0,01702013  | 0,53 | 0,01720513      | 0,64 |
| Yöntem*Materyal           | 1           | 0,00252050 | 0,16   | 0,00864612  | 0,27 | 0,00812813      | 0,30 |
| Hata                      | 4           | 0,01547400 |        | 0,03198113  |      | 0,02704863      |      |

\*p<0,05 , \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001

Optimum zein ve PCL nanopartikülleri farklı yöntem ve formülasyona sahip olmalarından dolayı gastrointestinal ortamlardaki salınımlarında da farklılıklar bulunmaktadır. Genel olarak, antioksidan kapasiteleri ağız ortamında en düşük olarak tespit edilirken, mide ve bağırsak ortamlarında kayda değer ölçüde artmış ve birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir (Çizelge 4.47). Bu durumun sıgla yağı nanopartiküllerinin *in vitro* sindirim ortamlarındaki salınım oranlarıyla doğrudan ilişkili

olduğu düşünülmektedir. Nitekim, ağız ortamında sıgla yağı salım oranı en düşüktür. Optimum nanopartiküllerin antioksidan kapasiteleri ağız, mide ve bağırsak sindirim ortamlarının hepsinde yöntem çeşidinden istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenirken, ağız ve bağırsak ortamlarında yöntem ve materyal çeşidinin her ikisinden de istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmektedir (Çizelge 4.48).

**Çizelge 4.47.** Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen antioksidan kapasiteleri değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

| DPPH (mg TE /g KM) |                          |                           |                          |                          |                          |                           |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Yöntem             | Ağız ortamı              |                           | Mide ortamı              |                          | Bağırsak ortamı          |                           |
|                    | BN                       | FN                        | BN                       | FN                       | BN                       | FN                        |
|                    | 0,382 <sup>a</sup> ±0,02 | 0,313 <sup>b</sup> ±0,007 | 0,739 <sup>a</sup> ±0,01 | 0,630 <sup>b</sup> ±0,01 | 0,571 <sup>a</sup> ±0,07 | 0,626 <sup>a</sup> ±0,003 |
| Materyal           | ZEİN                     | PCL                       | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                       |
|                    | 0,366 <sup>a</sup> ±0,03 | 0,329 <sup>a</sup> ±0,02  | 0,693 <sup>a</sup> ±0,03 | 0,676 <sup>a</sup> ±0,03 | 0,663 <sup>a</sup> ±0,02 | 0,534 <sup>b</sup> ±0,05  |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.48.** Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen antioksidan kapasiteleri değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

| DPPH (mg TE/g KM)      |             |            |          |             |         |                 |           |
|------------------------|-------------|------------|----------|-------------|---------|-----------------|-----------|
|                        | Ağız ortamı |            |          | Mide ortamı |         | Bağırsak ortamı |           |
|                        | SD          | KO         | F        | KO          | F       | KO              | F         |
| <b>Yöntem</b>          | 1           | 0,00938450 | 69,39*** | 0,02376200  | 31,34** | 0,00616050      | 19,79*    |
| <b>Materyal</b>        | 1           | 0,00281250 | 20,79**  | 0,00061250  | 0,81    | 0,03328200      | 106,93*** |
| <b>Yöntem*Materyal</b> | 1           | 0,00064800 | 4,79     | 0,00001800  | 0,02    | 0,03225800      | 103,64*** |
| <b>Hata</b>            | 4           | 0,00013525 |          | 0,00075825  |         | 0,00031125      |           |

\*p<0,05 , \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001

Optimum zein ve PCL nanopartikülleri farklı yöntem ve formülasyona sahip olmalarından dolayı gastrointestinal ortamlardaki salınımlarında farklılıklar bulunmaktadır. Genel olarak, TSA miktarları ağız ortamında en düşük olarak tespit edilirken, mide ve bağırsak ortamlarında kayda değer ölçüde artmış ve birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir (Çizelge 4.49). Optimum nanopartiküllerin TSA miktarları ağız, mide ve bağırsak sindirim ortamlarında yöntem ve materyal çeşidinden istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmiştir. Ağız ortamında tespit edilen TSA miktarı materyal çeşidinden istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenirken ve bağırsak ortamında tespit

edilen TSA miktarı yöntem çeşidinden istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmektedir. Mide ortamında tespit edilen TSA miktarı hem materyal hem de yöntem çeşidinin her ikisinden de istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmiştir (Çizelge 4.50).

**Çizelge 4.49.** Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TSA değerlerinin ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları.

| TSA miktarı (mg /g KM) |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Yöntem                 | Ağız ortamı              |                          | Mide ortamı              |                          | Bağırsak ortamı          |                          |
|                        | BN                       | FN                       | BN                       | FN                       | BN                       | FN                       |
| Materyal               | 0,507 <sup>a</sup> ±0,02 | 0,562 <sup>a</sup> ±0,01 | 1,417 <sup>a</sup> ±0,11 | 1,096 <sup>b</sup> ±0,03 | 1,201 <sup>a</sup> ±0,11 | 0,595 <sup>b</sup> ±0,01 |
|                        | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                      | ZEİN                     | PCL                      |
|                        | 0,437 <sup>b</sup> ±0,04 | 0,729 <sup>a</sup> ±0,16 | 1,329 <sup>a</sup> ±0,10 | 1,112 <sup>b</sup> ±0,03 | 0,902 <sup>a</sup> ±0,17 | 0,888 <sup>b</sup> ±0,04 |

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir. Aynı harflere sahip üretimler arası fark yoktur.

**Çizelge 4.50.** Optimum nanopartiküllerin ağız,mide ve bağırsak ortamında tespit edilen TSA değerlerine ait varyans analiz sonuçları.

| TSA miktarı (mg /g KM) |             |            |           |             |          |                 |           |
|------------------------|-------------|------------|-----------|-------------|----------|-----------------|-----------|
|                        | Ağız ortamı |            |           | Mide ortamı |          | Bağırsak ortamı |           |
|                        | SD          | KO         | F         | KO          | F        | KO              | F         |
| Yöntem                 | 1           | 0,00921924 | 3,89      | 0,30837069  | 90,66*** | 1,10135303      | 386,73*** |
| Materyal               | 1           | 0,22866114 | 96,43***  | 0,12581686  | 36,99*** | 0,00051779      | 0,18      |
| Yöntem*Materyal        | 1           | 0,34770208 | 146,64*** | 0,25336902  | 74,49*** | 0,59936646      | 210,46*** |
| Hata                   | 8           | 0,00237117 |           | 0,00340139  |          | 0,00284787      |           |

\*p<0,05 ,\*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001

#### 4.12. Biyolojik Aktivite Özellikleri

Sığıla yağının ve sığıla yağı dolgulu optimum nanopartiküllerin biyolojik aktivite özelliklerinin araştırması anti-ülseratif ve anti-karsinojenik etki analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

#### 4.12.1. Anti Ülseratif Etki

Üreaz, canlı organizmalarda azot metabolizmasının son aşaması olan ürenin karbondioksit ve amonyağa hidrolizini katalizleyen bir enzim olup reaksiyon sonucu ortam pH değerinde önemli artışa neden olduğundan insan gastrik sıvısı (pH:1-3) üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Mide epitel hücrelerini gastrik sıvıdan koruyan mukus tabakası üzerinde bulunan *Helicobacter pylori* ve *Proteus mirabilis* gibi bakteriler mide epitel hücresinden salgılanan üreyi su ve üreaz enzimi yardımıyla amonyağa dönüştürür ve alkali ortam oluşturur. Böylece bu bakterilerin gastrik sıvıdan korunarak gastrik epitel hücreler üzerine kolonizasyonu kolaylaşır (Khan vd., 2014). Üreaz enzimi insan fizyolojisi ile de tetiklenebilir ve gastrointestinal enfeksiyonlar, peptik ülser, mide kanseri ve böbrek taşı ve enfeksiyonları gibi hastalıkların oluşmasında ciddi rol oynar (Faiz ve Baltas, 2017; Khan vd., 2014). Bu hastalıkların tedavisinde üreaz enzimini inhibe edebilecek üreaz inhibitörleri yaygın olarak araştırılmaktadır.

Sığıla yağının gastrik koruma sağladığı ve antiülseratif etkiler gösterdiği akademik çalışmalarda bildirilmiştir (Gurbuz vd., 2013). Üreaz enzim aktivitesi indofenol yöntemi ile amonyak miktarı üzerinden belirlenir. Tez çalışmasında, ham sığıla balsamı, önişlemeden geçirilmiş sığıla yağı ve optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin anti-gastrik ülser koruyucu etkileri üreaz enzim inhibisyonu üzerinden indofenol metodu kullanılarak test edilmiştir. Ham sığıla balsamı, saflaştırma önişlemeden geçirilmiş sığıla yağı, optimum nanopartiküllerin ve anti-üreaz standardı (kontrol) olan tiyoürenin 25-50-100 ve 200 µg/mL dozlarda muamelesi sonucu % inhibisyon ve IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.51’de verilmiştir. Optimum nanopartikül örnekleri, basit nanoçöktürme ile elde edilen zein nanopartikülü BN-ZNP, flaş nanoçöktürme ile elde edilen zein nanopartikülü FN-ZNP, basit nanoçöktürme ile elde edilen PCL nanopartikülü BN-PCL-NP ve flaş nanoçöktürme ile elde edilen PCL nanopartikülü FN-PCL-NP olarak kodlanmıştır.

**Çizelge 4.51.** Ham sıgla yağı, sıgla yağı ve optimum nanopartiküllerin antiülser etkisi.

| Örnek             | % Üreaz enzim inhibisyonu |            |            |            |                          |
|-------------------|---------------------------|------------|------------|------------|--------------------------|
|                   | 25 µg/mL                  | 50 µg/mL   | 100 µg/mL  | 200 µg/mL  | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |
| Ham Sıgla yağı    | 38,17±0,35                | 53,21±0,46 | 66,98±0,37 | 81,17±0,83 | 44,66±0,70               |
| Sıgla Yağı        | 42,05±0,55                | 54,37±0,67 | 72,35±0,52 | 85,63±0,39 | 42,59±0,61               |
| BN-ZNP            | 15,30±0,17                | 26,15±0,44 | 39,63±0,21 | 50,90±0,25 | 195,2±0,57               |
| FN-ZNP            | 15,85±0,74                | 27,10±0,33 | 39,69±0,24 | 51,23±0,48 | 189,3±0,82               |
| BN-PCL-NP         | 18,26±0,91                | 29,98±0,28 | 43,87±0,31 | 55,80±0,60 | 151,4±0,76               |
| FN-PCL-NP         | 18,05±0,36                | 29,55±0,21 | 42,77±0,89 | 54,69±0,37 | 160,7±0,49               |
| Tiyoüre (Kontrol) | 63,84±0,49                | 72,57±0,65 | 85,20±0,98 | 92,70±0,77 | 8,62±0,41                |

Ham sıgla yağı ve saflaştırma önişleminden geçirilmiş sıgla yağının üreaz inhibisyon aktivitesi kontrol örneğine göre en yüksek ve birbirlerine yakın değerlerde tespit edilmiştir. Örneklerin IC<sub>50</sub> değeri incelendiğinde yüksek oranda üreaz inhibisyonu gösteren ekstrenin ham sıgla yağı ve saflaştırma önişleminden geçirilmiş sıgla yağı olduğu görülmüş ve IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 44,66 ve 42,59 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, saflaştırma önişleminin ham sıgla yağının biyolojik aktivite özellikleri üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir.

Optimum nanopartikül örnekleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en yüksek üreaz inhibisyon aktivitesi IC<sub>50</sub> değeri 151,4 µg/mL olan BN-PCL-NP örneğinde gözlenmiştir. Üreaz inhibisyon aktivitesine göre diğer örnekler yüksek değerden düşük değere göre sıralandığında, FN-PCL-NP, FN-ZNP ve BN-ZNP şeklinde sıralanmış ve IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 160,7, 189,3 ve 195,2 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, optimum nanopartiküllerin hepsinin üreaz inhibisyon aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Üreaz inhibisyon aktivitesi üzerine kaplama materyalinin üretim yönteminden daha etkili olduğu ve PCL ile elde edilmiş örneklerinin genel olarak daha yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

#### 4.12.2. Anti Kanser Etkisi

Günümüzde, standart olarak kabul edilen kanser tedavileri radyoterapi, kemoterapi, cerrahi yöntemleri kapsarken, destek tedaviler immünoterapi, kanser aşılıları (hücre hedefli), hormon terapisi, hedeflenmiş ilaçlar ve gen terapisi yöntemlerini içerir ve bu yöntemler tek başına veya birlikte uygulanabilmektedir (Baykara, 2016; Özlük

vd., 2017). Kanserin kişiye özgü bir hastalık olması tedavi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarının oluşmasına neden olur. Standart uygulanan tedavi yöntemlerinin zararlı hücrelerin yanında sağlıklı hücreleri de yok etmesi ve saç kaybı, kusma, halsizlik, iştahsızlık ve kaşeksi (kas kaybı) gibi yan etkilere neden olması gibi etmenlerden hormonal ve biyolojik tedaviler uygulanmaktadır. Biyolojik tedaviler, biyoaktif maddeler kullanılarak yeni ve hedefli anti-tümörojenik (kansere büyümesini önleyici) ajanların geliştirilmesini içerir (Baykara, 2016). Sığıla yağının antikanserojenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, çeşitli organ ve dokularda biriken oksidan maddelere (karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) radikalleri gibi) karşı günlük belirli oranda sığıla yağı kullanımının metabolizmada enzimsel antioksidan seviyelerini (GSH, GPx ve CAT gibi) arttırdığı ve kansere karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Aydingöz, 2013; Suzek vd., 2015).

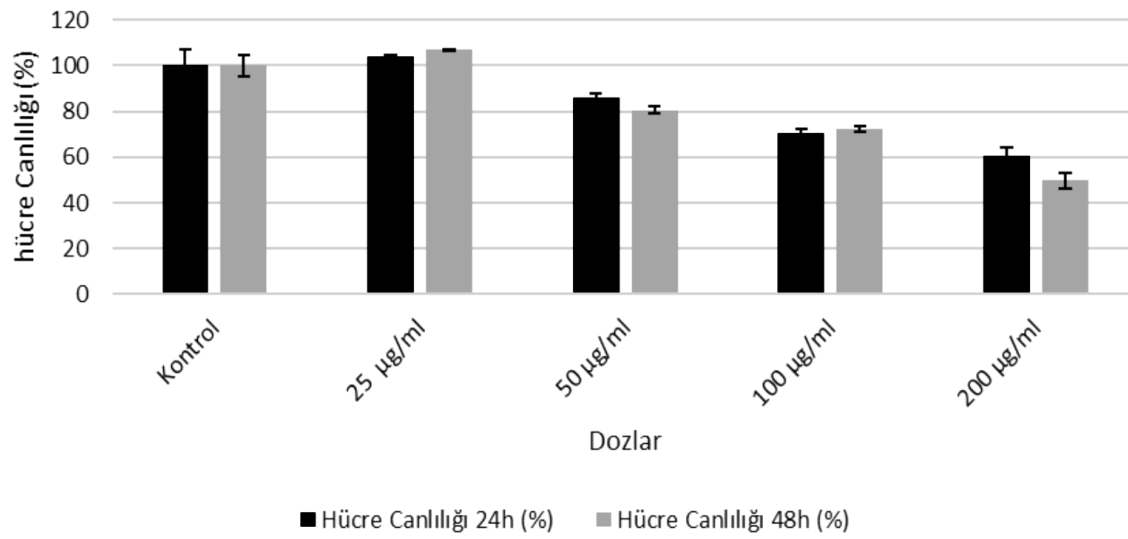
Tez çalışmasında ham sığıla yağının anti-karsinojenik etkisi PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatları üzerinde XTT hücre proliferasyon testi kullanılarak incelenmiştir. Sığıla yağının sitotoksik etkisi belirlenirken 25, 50, 100 ve 200  $\mu\text{g/ml}$  arasında değişen konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat boyunca PC3 ve LNCaP hücreleri üzerine muamele edilmiştir. Sığıla yağının PC3 ve LNCaP hücre hatları üzerinde 24 ve 48 saatlik muamele sonrası hücre canlılık değerleri Çizelge 4.52’de sunulmuştur. Bu doğal bileşiğin PC3 hücre hattı üzerinde hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri 24 saatlik muamelesinde çalışma aralığında bulunmamış, 48 saatlik muamelesinde 198,79  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplanmıştır. LNCaP hücre hattı üzerinde hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri 60,48  $\mu\text{g/mL}$  (24 saat) ve 59,89  $\mu\text{g/mL}$  (48 saat) olarak hesaplanmıştır. Diklorometan ve hekzan kullanılarak sığıla yağı ekstraktının *in vitro* sitotoksik etkisi çeşitli insan kanser hücreleri (HeLa (İnsan serviks adenokarsinomu), CaCo2 (İnsan kolon kolorektal adenokarsinomu) ve ), PC3 (insan prostat adenokarsinomu)) üzerinde MTT yöntemi ile incelenmiş, 0,5-50  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarda muameleleri ile 48 saat sonucunda  $IC_{50}$  değerleri diklorometanlı ekstrakt için sırasıyla >50, >50 ve 29,72  $\mu\text{g/mL}$  olarak ve haksanlı ekstrakt için sırasıyla 25,6, 39,83 ve 23,67  $\mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilmiştir (Nalbantsoy vd., 2016).

**Çizelge 4.52.** Sıgla yağının PC3 ve LNCaP hücre hatları üzerinde 24 ve 48 saat muameleye ait hücre canlılık değerleri sonuçları.

| Sıgla Yağı<br>Konsantrasyonu | Hücre Canlılık Oranı % |         |                      |         |
|------------------------------|------------------------|---------|----------------------|---------|
|                              | PC3 hücre hattında     |         | LNCaP hücre hattında |         |
|                              | 24 saat                | 48 saat | 24 saat              | 48 saat |
| Kontrol                      | 100                    | 100     | 100                  | 100     |
| 25 µg/ml                     | 103,89                 | 106,96  | 92,15                | 79,56   |
| 50 µg/ml                     | 86                     | 80,67   | 58,64                | 70,43   |
| 100 µg/ml                    | 70,63                  | 72,59   | 42,11                | 39,34   |
| 200 µg/ml                    | 60,52                  | 49,76   | 42,06                | 39,13   |

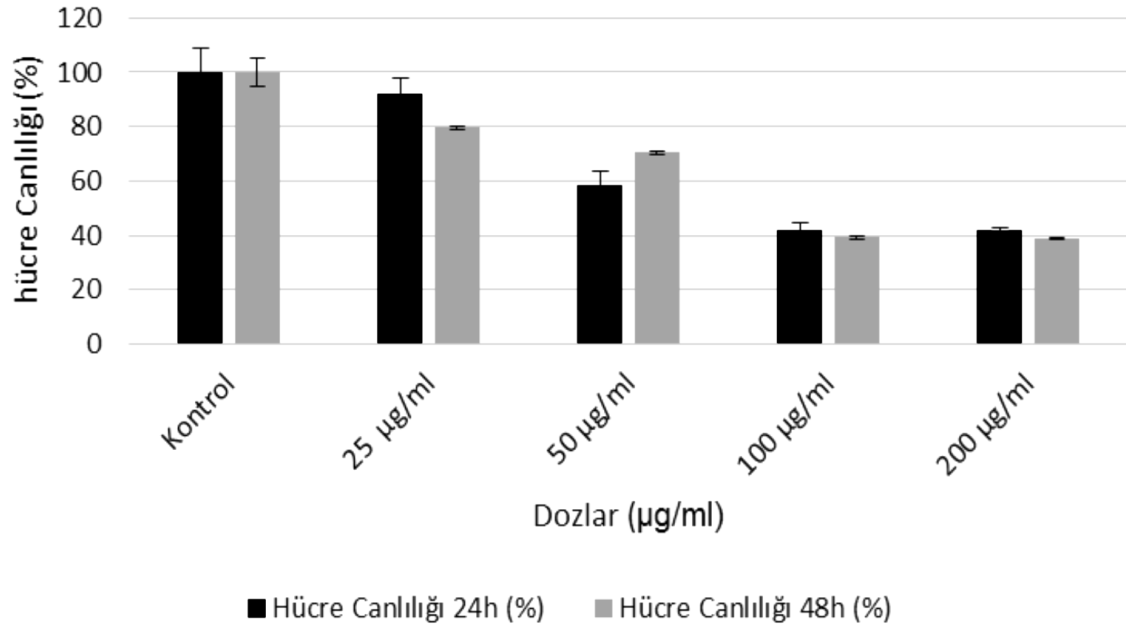
Çizelge 4.52 incelendiğinde, 24 saatlik muamelede kontrol grubuna kıyaslandığında özellikle PC3 hücreleri için 50 µg/ml ve LNCaP hücreleri için 25 µg/ml konsantrasyondan sonra hücre canlılığında önemli bir düşüş gözlenmiş ve bu oran PC3 hücreleri için %60,52'ye ve LNCaP hücreleri için %42,06'ye kadar azalmıştır. 48 saatlik muamele sonucunda özellikle PC3 hücreleri için 100 µg/ml ve LNCaP hücreleri için 50 µg/ml konsantrasyonundan sonra hücre canlılığı oranlarında dramatik bir düşme gözlenmiş ve bu oran PC3 hücreleri için %49,76'ya ve LNCaP hücreleri için %39,13'e kadar azalmıştır.

Şekil 4.20'de farklı konsantrasyonlarda uygulanan sıgla yağının PC3 hücreleri üzerinde 24-48 saat muameleye ait XTT sitotoksite testi sonuçlarının grafiği yer almaktadır. Grafikte, tüm zamanlara bakıldığında kontrol grubuna kıyasla 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığında bir değişim gözlenmemiştir. 50 µg/ml doz muamelesinde 24 saatte hücre canlılığı %14, 48 saatte %19 azalma göstermektedir. 100 µg/ml doz muamele sonucunda hücre canlılığı 24 saatte %70 ve 48 saatte %72 olarak gözlemlenmiştir. 200 µg/ml doz muamele sonucunda hücre canlılığı 24 saatte %60 ve 48 saatte %49 olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.20.** Ham sığla yağının PC3 hücreleri üzerine 24-48 saat muameleye ait XTT sitotoksite testi sonuçları.

Şekil 4.21’de farklı konsantrasyonlarda uygulanan sığla yağının LNCaP hücreleri üzerinde 24-48 saat muameleye ait XTT sitotoksite testi sonuçlarının grafiği yer almaktadır. Grafikte, tüm zamanlara bakıldığında kontrol grubuna kıyasla 25 µg/ml doz muamelesinde 24 saatte hücre canlılığı %8, 48 saatte %21 azalma göstermektedir. 50 µg/ml doz muamele sonucunda hücre canlılığı 24 saatte %58 ve 48 saatte %70 olarak gözlemlenmiştir. 100 µg/ml doz muamele sonucunda hücre canlılığı 24 saatte %42 ve 48 saatte %39 olarak tespit edilmiştir. Son olarak 200 µg/ml doz muamele sonucunda hücre canlılığı 24 saatte %42 ve 48 saatte %39 olarak gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.21.** Ham sıgla yağının LNCaP hücreleri üzerine 24-48 saat muameleye ait XTT sitotoksite testi sonuçları.

Bu sonuçlara göre, sıgla yağı sitotoksik etkisine karşı prostat kanseri hücre hatlarından PC3 hücrelerinin LNCaP hücrelerine kıyasla daha dirençli olduğu ve sıgla yağının anti-kanser aktivitesinin LNCaP hücreleri üzerinde daha yüksek inhibisyon sergileyerek daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

#### 4.13. Duyusal Analiz

Optimum zein nanopartikül tozlarının duyusal kabul edilebilirlik değerlendirmesi, renk, topaklanma derecesi, sıgla yağı lezzet yoğunluğu, ağızda hissedilen doku ve yabancı lezzet özellikleri için 1-5 puanlama skalasında 10 kişilik yarı eğitilmiş panel grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak ticari satın alınan ham sıgla yağı kullanılmıştır. Optimum zein nanopartikül tozlarının duyusal değerlendirmesinde kullanılan form Çizelge 4.53’de verilmiştir.

**Çizelge 4.53.** Zein nanopartikül tozları duyuşal değerdendirme formu.

| Özellik                               | Nitelik                              | Puan |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------|
| <b>Renk</b>                           | Koyu-krem-sarı                       | 5    |
|                                       | Açık krem-sarı                       | 4    |
|                                       | Krem rengi                           | 3    |
|                                       | Beyaz                                | 2    |
|                                       | Kahverengi-gri                       | 1    |
| <b>Topaklanma</b>                     | Toz rahatlıkla dağılıyor             | 5    |
|                                       | Tozda hafif topaklanma mevcut        | 4    |
|                                       | Tozda orta düzeyde topaklanma mevcut | 3    |
|                                       | Toz çok fazla topaklanmış            | 2    |
|                                       | Toz rahatlıkla dağılmıyor            | 1    |
| <b>Sığla yağı-SL lezzet yoğunluğu</b> | SL lezzeti yok                       | 5    |
|                                       | SL lezzeti zayıf                     | 4    |
|                                       | SL lezzeti orta düzeyde belirgin     | 3    |
|                                       | SL lezzeti belirgin                  | 2    |
|                                       | SL lezzeti çok belirgin              | 1    |
| <b>Ağızda hissedilen</b>              | Kuru                                 | 5    |
|                                       | Pürüzlü                              | 4    |
|                                       | Kadifemsi                            | 3    |
|                                       | Kremamsı                             | 2    |
|                                       | Yağlı                                | 1    |
| <b>Yabancı lezzet</b>                 | Yabancı lezzet yok                   | 5    |
|                                       | Yabancı lezzet zayıf                 | 4    |
|                                       | Yabancı lezzet orta düzeyde belirgin | 3    |
|                                       | Yabancı lezzet belirgin              | 2    |
|                                       | Yabancı lezzet çok belirgin          | 1    |

Zein nanopartikül tozlarının duyuşal analiz sonuçları Çizelge 4.54’de verilmiştir. Zein nanopartikül tozlarının duyuşal özellikleri incelendiğinde sığla yağı lezzet yoğunluğu basit nanoçöktürme (BN) yöntemi ile elde edilen örnekte flaş nanoçöktürme (FN) yöntemi ile elde edilen örneğe göre daha yüksek bulunmuştur. *İn vitro* sindirim analizinde ağız ortamı sığla yağı salınım ortalamaları BN yöntemiyle elde edilen zein nanopartiküllerinde %2,73, FN yöntemiyle elde edilen zein nanopartiküllerinde %1,74 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Çizelge 4.54’deki sonuçlara göre FN yöntemi ile üretilen zein nanopartikül toz örnekleri sığla yağı lezzet yoğunluğu açısından ağız ortamı sindirim analizi sonuçları ile uyumlu olarak BN yöntemi ile üretilen zein nanopartikül toz örneklerinden daha yoğun sığla yağı lezzeti içeriğine sahip bulunmuştur. Duyuşal analiz sonuçlarına göre, nanoçöktürme yöntem çeşidinin sığla yağı lezzet yoğunluğu üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.55). Optimum zein nanopartikül toz örnekleri topaklanma açısından panelistler tarafından değerdendirildiğinde, BN yönteminin FN yöntemine göre daha yüksek topaklanma puanı aldığı görülmüştür. Bu sonuç, toz örneklerin akabilirlik sonuçları ile karşılaştırıldığında Carr İndeks değerdeleri BN yönteminde 25 (zayıf), FN yönteminde ise

37,5 (kötü) değerlerde ve duyu analizi sonuçlarıyla uyumsuz bulunmuş ve fiziksel sonuçların duyu algıda çok belirleyici olmadığı anlaşılmıştır. Duyu analizi sonuçlarına göre, nanoçöktürme yöntemi çeşidinin topaklanma üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.55). Panelistlerin değerlendirdiği diğer özelliklerden renk, ağızda hissedilen ve yabancı lezzet kategorileri birbirlerine yakın puanlar almış ve yöntem çeşidinin bu kategoriler üzerinde etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

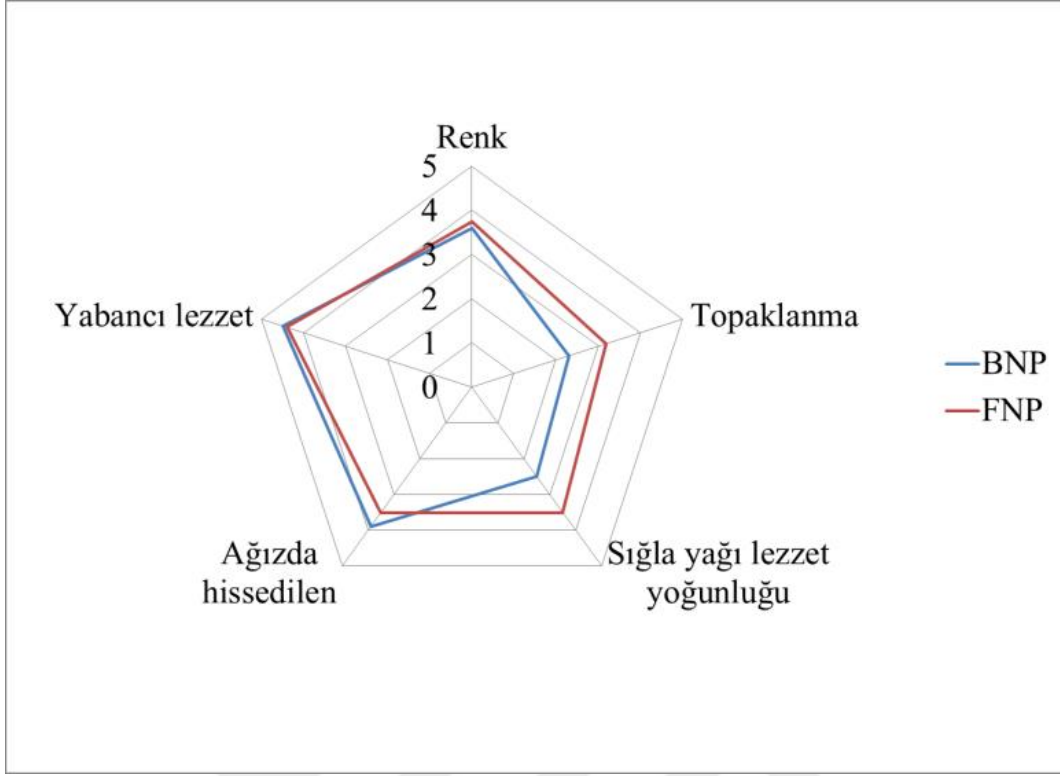
**Çizelge 4.54.** Basit nanoçöktürme (BN) ve flaş nanoçöktürme (FN) yöntemi ile elde edilen optimum ZNP'nin duyu analizi sonuçları.

| Yöntem | Renk      | Topaklanma | Duyu Özellikler             |                   |                |
|--------|-----------|------------|-----------------------------|-------------------|----------------|
|        |           |            | Sığla yağı lezzet yoğunluğu | Ağızda hissedilen | Yabancı lezzet |
| BN     | 3,60±0,16 | 2,30±0,26  | 2,50±0,31                   | 3,90±0,27         | 4,50±0,31      |
| FN     | 3,70±0,21 | 3,20±0,33  | 3,50±0,27                   | 3,50±0,37         | 4,40±0,26      |

**Çizelge 4.55.** Basit nanoçöktürme (BN) ve flaş nanoçöktürme (FN) yöntemi ile elde edilen optimum ZNP'nin varyans analizi sonuçları.

| Özellik                     | Varyasyon    | SD | KO    | F     |
|-----------------------------|--------------|----|-------|-------|
| Renk                        | Metot çeşiti | 1  | 0.050 | 0,14  |
|                             | Hata         | 18 | 0.361 |       |
| Topaklanma                  | Metot çeşiti | 1  | 4.050 | 4,64* |
|                             | Hata         | 18 | 0.872 |       |
| Sığla yağı lezzet yoğunluğu | Metot çeşiti | 1  | 5.000 | 6,00* |
|                             | Hata         | 18 | 0.833 |       |
| Ağızda hissedilen           | Metot çeşiti | 1  | 0.800 | 0,74  |
|                             | Hata         | 18 | 1.077 |       |
| Yabancı lezzet              | Metot çeşiti | 1  | 0.050 | 0,06  |
|                             | Hata         | 18 | 0.827 |       |

Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile elde edilen optimum zein nanopartikül tozlarının duyu analizi grafiği Şekil 4.22'de verilmiştir. Grafiğe göre renk, topaklanma ve lezzet yoğunluğu özellikleri açısından flaş nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen örnekler panelistler tarafından daha kabul edilebilir bulunurken, ağızda hissedilen doku ve yabancı lezzet özellikleri açısından basit nanoçöktürme yöntemi ile elde edilen örnekler daha kabul edilebilir bulunmuştur.



**Şekil 4.22.** Basit ve flaş nanoçöktürme yöntemleri ile SL dolgulu optimum zein nanopartikül tozlarının duyu analizi grafiği.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında, ham sığla balsamı tüketim ve işleme zorluğu nedeniyle önışlemden geçirilerek safsızlıklarından ayrılmış ve nanoenkapsülasyon işlemi için uygun hale getirilmiştir. Sığla yağının, farklı taşıyıcı materyaller içine farklı yöntemlerle nano boyutta enkapsülasyonu ile bioaktif madde içeriğinin korunması, *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli içinde yer alan ağız ortamında salınımının engellenmesi ve mide-bağırsak ortamında salınımının sağlanması tez çalışmasının amaçlarındandır.

Sığla yağı nanoenkapsülasyonu, organik (zein) ve inorganik (poli  $\epsilon$ -kaprolakton-PCL)) farklı taşıyıcı materyaller kullanılarak basit nanoçöktürme (BN) ve flaş nanoçöktürme (FN) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Zein nanopartikülleri üretiminde, her iki yöntem için zein konsantrasyonu, sığla yağı oranı, organik solvent faz akış hızı ve karıştırma hızı proses değişkenleri olarak seçilmiş ve partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve *in vitro* sindirim (ağız-mide) analizi yanıtlarına göre optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemde de nanopartiküllerin partikül boyutu zein konsantrasyonundan ve enkapsülasyon etkinliği değerleri zein konsantrasyonu ve sığla yağı oranından doğrudan etkilenmiştir. BN yönteminde yanıtlar üzerinde proses değişkenlerinden organik solvent faz akış hızı daha etkiliyken, FN yönteminde yanıtlar üzerinde proses değişkenlerinden karıştırma hızı daha etkili bulunmuştur. Bu sonuç, nanoçöktürme yöntemlerinin farklılığı ile doğrudan bağlantılı olup, BN yönteminde çekirdeklenme ve stabilizasyon aşamalarının aynı çözelti hacmi içinde gerçekleşmesi ve FN yönteminde çekirdeklenme ve stabilizasyon aşamalarının birbirlerinden ayrı çözelti hacimleri içinde gerçekleşmesi ile ilişkilendirilmiştir. BN ve FN yöntemleri ile üretilen optimum zein nanopartikülleri sırasıyla 225,59 nm ve 191,14 nm partikül boyutlarına ve %71,24 ve %82,64 enkapsülasyon etkinliğine sahip bulunmuştur. Partikül boyutları SEM görüntüleri ile uyumludur. Sığla yağı oranı her iki yöntemde de zein nanopartiküllerinin *in vitro* ağız ve mide sindirim ortamlarında salınım özellikleri üzerinde en etkili proses değişkeni olarak bulunmuştur. Yüksek sığla yağı içeriğine sahip nanopartiküller yüksek oranda salınım göstermiştir.

Optimum zein nanopartiküllerinin kolloidal çözelti içinde kararlılıkları üç hafta süresince incelenmiş, BN yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin boyutları 399,53 nm, PDI %0,21 ve zeta potansiyel değerleri -19,80 mV olarak bulunmuş, FN yöntemi ile elde edilen optimum nanopartiküllerin boyutları 179,87 nm, PDI %0,22 ve zeta potansiyel değerleri 29,93 mV olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak FN yöntemi ile BN yöntemine göre daha uzun süre kararlı zein nanopartiküllerin üretimi sağlanmıştır.

Sığıla yağı dolgulu PCL nanopartikülleri üretiminde BN ve FN yöntemleri için ayrı olarak belirlenen farklı üretim koşullarında her bir yöntem için farklı sığıla yağı oranlarında yüklemeler yapılmış ve BN yöntemi için maksimum %2, FN yöntemi için ise maksimum %3 sığıla yağı dolgulu nanopartikül tozları üretilmesine karar verilmiştir. Yüksek sığıla yağı oranlarında her iki yöntem için de enkapsülasyon etkinlikleri ve ürün verimleri dramatik olarak düşmüştür. BN yöntemi ile üretilen PCL nanopartikülleri boyutları 258,67 nm ile 510,00 nm aralığında değişim gösterirken, FN yöntemi ile üretilen PCL nanopartiküllerinin boyutları 225,88 nm ile 389,98 nm aralığında değişim göstermiştir. Partikül boyutları SEM görüntüleri ile uyumlu bulunmuştur. FN yöntemi ile üretilen PCL nanopartiküllerinin *in vitro* sindirim analizinde ağız ve mide ortamlarındaki sığıla yağı salınımları BN yöntemi ile üretilen nanopartiküllerin salınımına kıyasla daha düşük seviyelerde bulunmuştur.

Optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin *in vitro* sindirim analizinde, ağız ortamındaki sığıla yağı salınımı, mide ve bağırsak ortamlarındaki salınımına göre, hedeflendiği gibi düşük oranda bulunmuştur.

Sığıla yağı nanoenkapsülasyonu için uygun materyal ve yöntem karşılaştırması, optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin *in vitro* gastrik ortamda zamana bağlı salınım profili üzerinden incelenmiştir. Optimum nanopartiküllerin hepsinin ilk 15 dk'da patlama salınımı yaptıkları belirlenmiş ve %20 ile en düşük patlama salınım ile uzun süreli yavaş salınım profili gösteren materyal PCL, yöntem ise flaş nanoçöktürme olarak belirlenmiştir.

Sığıla yağı dolgulu optimum zein ve PCL nanopartiküllerinin benzer fiziksel özellikler gösterdiği, kimyasal özelliklerinin ise yöntem ve materyal türünden doğrudan etkilendiği bulgulanmıştır.

Sığıla yağının ve her iki yöntemle elde edilen optimum zein ve PCL nanopartikül tozlarının anti-ülseratif etkileri üreaz enzim inhibisyonu üzerinden incelenmiş ve en

yüksek inhibisyon sıgla yağından sonra sırasıyla BN-PCL, FN-PCL, FN-zein ve BN-zein nanopartiküllerinde tespit edilmiştir. Tüm optimum nanopartiküllerin anti-ülseratif etkiye sahip olduğu ve PCL taşıyıcı materyali ile elde edilen sıgla yağı dolgulu nanopartiküllerin zein taşıyıcı materyali ile elde edilenlerden daha yüksek üreaz inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir.

Ham sıgla yağının PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi 25, 50, 100 ve 200 µg/ml arasında değişen dozlarda 24 ve 48 saat boyunca muamele ile incelenmiştir. Bu doğal bileşiğin PC3 hücre hattı üzerinde hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri 24 saatlik muamelesinde bulunmamış, 48 saatlik muamelesinde 198.79 µg/mL olarak hesaplanmıştır. LNCaP hücre hattı üzerinde hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri 60.48 µg/mL (24 saat) ve 59.89 µg/mL (48 saat) olarak tespit edilmiştir.

Optimum zein nanopartiküllerinin duysal olarak ham sıgla yağına kıyasla her iki yöntemle de üretildiğinde kabul edilebilir olduğu ve sıgla yağı lezzet yoğunluğu ile topaklanma özellikleri açısından FN yöntemi ile üretilen zein nanopartikül tozlarının tüketiciler tarafından daha tercih edilebilir olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmanın, sıgla yağının farklı yöntemler ve/veya farklı kaplama materyalleri kullanılarak yapılacak nanoenkapsülasyon çalışmalarına, yeni ve hedefli anti-ülserojenik ve anti-tümörolojik ajan geliştirme araştırmalarına öncülük etmesi beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abbasi-Kangevari, M., Ahmadi,N., Fattahi,N., Rezaei,N., Malekpour,M. (2022). Quality of care of peptic ulcer disease worldwide: A systematic analysis for the global burden of disease study 1990–2019. *Plos One*, 1-15. doi:10.1371/journal.10.1371/journal.pone.0271284 10.17504/protocols.io
- Abdelwahed, W., Degobert,G., Stainmesse, S., Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1688–1713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017
- Ali, M. E., Lamprecht, A. (2017). Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 516, 170-177. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.023
- Almouazen, E., Bourgeois,S., Jordheim,L.P., Fessi,H., Briançon,S. (2013). Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: Formulation study and in vitro evaluation. *Pharm Res*, 30, 1137–1146. doi:10.1007/s11095-012-0949-4
- Altıparmak, M., Kule, M., Öztürk,Y., Çelik, S. Y., Öztürk, M., Duru, M. E., Koçer, U. (2019). Skin wound healing properties of *hypericum perforatum*, *liquidambar orientalis*, and propolis mixtures. *European Journal of Plastic Surgery*, 42, 489–494. doi:10.1007/s00238-019-01538-6
- Anandharamakrishnan, C. (2014). *Techniques for nanoencapsulation of food ingredients*. USA: Springer.
- Andrikopoulos, N. K., Papapeorgiou, V. P., Kaliora, A. C., Assimopoulou, A. N.,Papapeorgiou, V. P. (2003). Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* ldl oxidation. *Phytotherapy Research*, 17, 501–507. doi:10.1002/ptr.1185
- Arruda, S. C. C., Silva, A.L.D., Galazzi, R.M., Azevedo, R.A., Arruda, M.A.Z. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, 131, 693–705. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.050

- Arshad, R., Gulshad,L., Haq,I.U., Farooq,M.A., Al-Farga,A. (2021). Nanotechnology: A novel tool to enhance the bioavailability of micronutrients. *Food Science and Nutrition*, 3354-3361. doi:10.1002/fsn3.2311
- Aydınöz, M. (2013). *Karbontetraklorür'ün karaciğerde meydana getirdiği toksikasyona karşı liquidambar orientalis'ten elde edilen ekstraktların koruyucu etkisinin araştırılması*. (Doktora), Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- Badri, W., El Asbahani, A., Miladi, K., Baraket, A., Agusti, G., Nazari, Q. A., Elaissari, A. (2018). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and nigella sativa l. Essential oil for the topical treatment of inflammation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 234-242.
- Balta, A. B. (2010). *Development of natural compound-loaded nanofibers by electrospinning*. (Master of science), İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey.
- Barreras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong,B., López-, & Ahumada, G. A. (2016). Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: Possible application in the food and agricultural industries. *International Journal of Food Properties*, 19, 1912–1923. doi:10.1080/10942912.2015.1089279
- Bayazit, V. (2009). Effects of sweet gum (liquidambar orientalis), mulberry leaves (morus alba) and the larval ganglion extracts of silkworm (bombyx mori) on stroke parameters (hemoglobin, strokin, cortexin, frontalin, temporalin, parietalin, occipitalin, brain ventriculin, hemorrhagic clot) in rabbits (lepus capensis). *Journal of animal and veterinary advances*, 8(11), 2164-2170.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165. doi:10.5505/bsbd.2016.93823
- Bayramoğlu, E. E. (2010). Possibility of using sığla tree (liquidambar orientalis mill. Var orientalis) storax as bactericide in the soaking float. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 105, 62-68.
- Bazana, M. T., Codevilla,C. F., Menezes,C.R. (2019). Nanoencapsulation of bioactive compounds: Challenges and perspectives. *Food Science*, 26, 47-56. doi:10.1016/j.cofs.2019.03.005
- Botet, R. (2012). *The" ouzo effect", recent developments and application to therapeutic drug carrying*. Paper presented at the Journal of Physics: Conference Series.

- Bratovic, A., Suljagic, J. (2019). Micro- and nano-encapsulation in food industry. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 113-121. doi:10.17508/CJFST.2019.11.1.17
- Brian, P. L. T., Ross, J.R. (1972). The effect of gibbs adsorption on marangoni instability in penetration mass transfer. *AIChE Journal*, 18(3), 582-591. doi:10.1002/aic.690180319
- Bulut, G., Haznedaroğlu, M. Z., Doğan, A., Koyu, A., Tuzlacı, E. (2017). An ethnobotanical study of medicinal plants in acipayam (denizli-turkey). *Journal of Herbal Medicine*, 10, 64-81. doi:10.1016/j.hermed.2017.08.001
- Carr, R. L., Jr. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*, 72(3), 163-168.
- Charehzah, M., Reis, R., Helvacioğlu, S., Sipahi, H., Guzelmeric, E. (2016). Safety evaluation of styrax liquidus from the viewpoint of genotoxicity and mutagenicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 506-512. doi:10.1016/j.jep.2016.10.037
- Chávez-Magdaleno, M. E., Luque-Alcaraz, A. G., Gutiérrez-Martínez, P., Cortez-Rocha, M., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., & Plascencia-Jatomea, M. (2018). Effect of chitosan-pepper tree (schinus molle) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of colletotrichum gloeosporioides. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 29-45.
- Çıtlak, G., Yurttari, M.E., Soytaş, Y., Yüksel, S. (2020). Does being a refugee affect prognosis in patients who underwent surgery due to peptic ulcer perforation? *Ulus Travma Acil Cerrahi Dergisi*, 26(5), 713-718. doi:10.14744/tjtes.2020.44902
- Cordt, C., Meckel, T., Geissler, A., Biesalski, M. (2020). Entrapment of hydrophobic biocides into cellulose acetate nanoparticles by nanoprecipitation. *Nanomaterials*, 10, 1-15.
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry e recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*, 24, 30-46. doi:10.1016/j.tifs.2011.10.006

- Değirmen-tepe, S., Baysal,E., Turkoğlu,T.,Toker,H., Deveci,İ. (2015). Some properties of turkish sweetgumbalsam(styrax liquidus) impregnated oriental beech wood part ii: Decay resistance,mechanical and thermal properties. *Wood Research*, 60(4), 591-604.
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A.G., Barba,F.J. (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 72-83. doi:10.1016/j.tifs.2020.07.004
- Demirtaş, H., Sengel-Turk, C.T. (2022). New generation lipid-based drug delivery systems:Lipid nanocapsules: Yeni nesil lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler: Lipit nanokapsüller. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 46(1), 240-260.
- Dordevic, V., Balanc, B., Belcak-Cvitanovic,A., Levic,S., Trifkovic, K. Kalusevic, A., Kostic, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedovic, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Eng Rev*, 7, 452-490. doi:10.1007/s12393-014-9106-7
- Duvall, M. N. (2012). *Fda regulation of nanotechnology*.
- EFSA (2009) Scientific opinion on ‘the potential risks arising from nanoscience and nanotechnologies on food and feed safety’. European Food Safety Authority (Series Ed.): Vol. 958. *The EFSA Journal* (pp. 1-39).
- Ephrem, E., Greige-Gerges, H., Fessi, H., Charcosset, C. (2014). Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of microencapsulation*, 31(8), 746–753. doi:10.3109/02652048.2014.918669
- Esfandyari-Manesh, M., Ghaedi, Z., Asemi, M., Khanavi, M., MAnayi, A., Jamalifar, H. (2013). Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded plga nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 7, 290-295. doi:10.1016/j.jopr.2013.04.019
- Ezhilarasi, P. N., Karthik P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C. . (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. *Food Bioprocess Technol*, 6, 628-647. doi:10.1007/s11947-012-0944-0

- Faiz, O., Baltas, N. (2017). Polyphenol oxidase properties, anti-urease, and anti-acetylcholinesterase activity of diospyros lotus (plum persimmon). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1186–1196. doi:10.1080/10942912.2016.1205086
- Fathi, M., Mozafari, M. R., Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Food Science & Technology*, 23, 13-27. doi:10.1016/j.tifs.2011.08.003
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Pineros, M. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer* 149, 778–789. doi:10.1002/ijc.33588
- Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A., Perichet, C., Delbecq, C., Arnaudo, J. (2005). Chemical composition of the essential oils from turkish and honduras styrax. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 70-73. doi:10.1002/ffj.1370
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J., Ammoury, N. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55, R1-R4.
- Froio, F., Ginot, L., Paolino, D., Lebaz, N., Bentaher, A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2019). Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers*, 11(6), 1017. doi:10.3390/polym11061017
- Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H., Ray, P. C. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 64-75. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.005
- Fu, Z., Li, L., Wang, M., Guo, X. . (2018). Size control of drug nanoparticles stabilized by mpeg-b-pcl during flash nanoprecipitation. *Colloid and Polymer Science*, 296, 935–940. doi:10.1007/s00396-018-4311-1
- GCO. (2020). Turkey cancer statistics. The Global Cancer Observatory- *International Agency for Research on Cancer*- <https://gco.iarc.fr/>
- Gül, G. S. (1986). *Sığla ağacı (liquidambar orientalis mill.) kabuk sıyrıntılarından yağ elde etme yöntemleri üzerine araştırmalar*. Ankara: Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları.

- Guo, H., Feng, Y., Deng, Y., Yan, T., Liang, Z., Zhou, Y. (2023). Continuous flow modulates zein nanoprecipitation solvent environment to obtain colloidal particles with high curcumin loading. *Food Hydrocolloids*, 134(108089), 1-11. doi:10.1016/j.foodhyd.2022.108089
- Gurbuz, I., Yesilada, E., Demirci, B., Sezik, E., Demirci, F., Baser, K. H. C. (2013). Characterization of volatiles and anti-ulcerogenic effect of turkish sweetgum balsam (*styrax liquidus*). *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 332–336. doi:10.1016/j.jep.2013.03.071
- Gürdal, B., Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in marmaris (muğla, turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 113–126. doi:10.1016/j.jep.2012.12.012
- Guterres, S. S., Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R. (2009). Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: A brief overview. *Brazilian Journal of Physics*, 39(1A), 205-209.
- Hafizoğlu, H. (1982). Analytical studies on the balsam of liquidambar orientalis mill. By gas chromatography and mass spectrometry. *Holzforschung*, 36, 311-313.
- Hafizoğlu, H. (1996). Chemical constituents of balsam from liquidambar orientalis. *Holzforschung*, 50, 116-117.
- Hamza, R. (2023). *Analysis of the problems of pharmaceutical provision of gastric ulcer patients in the countries of the world*. (Master of Science), Ministry of Health of Ukraine National University, Kharkiv.
- Han, J., Zhu, Z., Qian, H., Wohl, A.R., Beaman, C.J., Hoyer, T.R. (2012). A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *Journal of Pharmaceutical Science*, 101(10), 4018-4023. doi:10.1002/jps.23259
- Hirsjarvi, S. (2008). *Preparation and characterization of poly(lactic acid) nanoparticles for pharmaceutical use*. (Doktora tezi), Helsinki üniversitesi, Finlandiya.
- Ho, B., Chin, S., Lihan, S. (2022). Antibacterial studies of penicillin g loaded carboxylic cellulose acetate nanoparticles. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(6), 8105-8116. doi:10.33263/BRIAC126.81058116
- Huş, S. (1949). *Sığla ağacının (liquidambar orientalis mill.) ormancılık bakımından önemi ve sığla yağının kimyasal araştırılması*. İstanbul: T.C. Tarım Bakanlığı.

- Hwang, N., Barron, A.R. (2011). Bet surface area analysis of nanoparticles. *OpenStax-CNX*, 1-11
- İlyasoğlu, H., El, S.N. (2010). Nanoemülsiyonlar: Oluşumları,yapıları ve kolloidal salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *Gıda*, 15(2), 1-8.
- İstek, A. (1994). *Sığla yağı (storax)'nın kimyasal bileşenleri*. (Yüksek lisans Yüksek lisans), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- İstek, A., Hafizoğlu,H. (2005). Sığla ağacı (liquidambar orientalis mill.) odunu ve kabuğunun kimyasal bileşenleri. *Gazi Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi-Kastamonu*, 5(1), 1-127.
- Jabbar, A. A. J., Mothana,R.A., Abdulla,M.A., Abdullah,F.O., Ahmed, K.A. (2023). Mechanisms of anti-ulcer actions of prangos pabularia (l.) in ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31(101850), 1-13. doi:10.1016/j.jsps.2023.101850
- Jallo, L. J., Ghoroi,C., Gurumurthy,L.,Patel,U. (2012). Improvement of flow and bulk density of pharmaceutical powders using surface modification. *International Journal of Pharmaceutics*, 423, 213– 225. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.012
- Karadeniz, B., Ulker,Z., Alpsoy,L. (2011). Genotoxic and cytotoxic effects of storax in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 29(2), 181-186. doi:10.1177/0748233711428642
- Kartal, S. N., Terzi, E., Yoshimura, T., Arango, R., Clausen, C. A., Green, F. (2012). Preliminary evaluation of storax and its constituents: Fungal decay, mold and termite resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 47-54. doi:10.1016/j.ibiod.2012.02.002
- Kesente, M., Kavetsou,E., Roussaki,M. (2017). Encapsulation of olive leaves extracts in biodegradable pla nanoparticles for use in cosmetic formulation. *Bioengineering*, 4(75). doi:10.3390/bioengineering4030075
- Khan, H., BPharm,M., Khan,M.A. (2014). Antiulcer effect of extract/fractions of eruca sativa: Attenuation of urease activity. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 19(3), 176-180. doi:10.1177/2156587214527452

- Khan, R., Rehman,A., Hayat,A. ,Andreescu, S. (2019). Magnetic particles-based analytical platforms for food safety monitoring. *Magnetochemistry*, 5(63). doi:10.3390/magnetochemistry5040063
- Kılınçarslan, H., Kalyon,S.,Yenice,N. (2011). Peptik ülser etyopatogenezi. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 27(2), 65-69. doi:10.5222/otd.2011.065
- Kim, S., Kim,J.C., Sul,D.,Hwang,SW. (2011). Nanoparticle formulation for controlled release of capsaicin. *Nanoscience and Nanotechnology*, 11( 2011), 4586–4591. doi:10.1166/jnn.2011.3636
- Kirik, T., Kızılbey, K. (2019). Rutin yüklü plga nanopartiküller; farklı yöntemler kullanılarak sentezi ve karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2). doi:10.21597/jist.481180
- Kırtıl, E., Öztop, M.H. (2014). Enkapsülasyon maddesi olarak lipozom ve gıdalarda kullanımı: Yapısı, karakterizasyonu, üretimi ve stabilitesi. *Akademik Gıda*, 12(4), 41-57.
- Koç, M., Sakin, M., Kaymak-Ertekin,F. (2010). Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 77-86.
- Kültür, Ş., Altınbaşak, O., Anıl,S.,Melikoğlu, G. (2018). Türkiye de mide ülserinde kullanılan tıbbi bitkiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(1), 1-14. doi:10.12991/mpj.2018.35
- Kumar, R., Lal,S. (2014). Synthesis of organic nanoparticles and their applications in drug delivery and food nanotechnology: A review. *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology*, 3(4). doi:10.4172/2324-8777.1000150
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A. H., Elaissari, A. (2020). Encapsulation of essentialoils viananoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. *Pharmaceutics*, 12(431), 1-21. doi:10.3390/pharmaceutics12050431

- Lammari, N., Louaer,O., Meniai,H., Fessi,H. (2021). Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. *International Journal of Pharmaceutics*, 601(120538), 1-34.
- Lee, S. H., Heng, D., Ng, W.K., Chan, H., Tan, R.B.H. (2011). Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 192-200. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.012
- Lee, Y., Kim, J., Lee, S., Oh, E., Shin, S., Park, K. (2009). Effects of plant essential oils and components from oriental sweetgum (*liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 138–143. doi:10.1016/j.pestbp.2009.02.002
- Lepeltier, E., Bourgaux, C.,Couvreux, P. (2014). Nanoprecipitation and the “ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 86-97. doi:10.1016/j.addr.2013.12.009
- Li, K., Zhang, X., Huang,Q., Yin, S. Yang,X. (2014). Continuous preparation of zein colloidal particles by flash nanoprecipitation (fnp). *Journal of Food Engineering*, 127, 103–110. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.12.001
- Liakos, L. I., Iordache,F.,Carzino, R., Scarpellini, A.,Oneto, M.,Bianchini, P. (2018). Cellulose acetate-essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 471-479.
- Lingbeck, J. M., O'Bryan, C.A., Martin, E. M., Adams, J. P., Grandall, P.G. (2015). Sweetgum: An ancient source of beneficial compounds with modern benefits. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 1-11. doi:10.4103/0973-7847.156307
- Loureiro, J., Miguel,S.P., Ribeiro,M.P. (2022). Single-step self-assembly of zein–honey–chitosan nanoparticles for hydrophilic drug incorporation by flash nanoprecipitation. *Pharmaceutics*, 14(920), 2-14. doi:10.3390/10.3390/pharmaceutics14050920
- Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante,J.A.,Rocha-Guzmán, N.E., Moreno-Jiménez, M.R. (2020). Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(2), 491-521. doi:10.24275/rmiq/Alim642

- Marcarz, G. F. F., Laba, L. C., Silva, T. A. M., Pazzim, M. S., Souza, D., Prado, M. R. M., Souza, L. M., Nakashima, T., Mello, R.G. (2019). Chemical composition and biological activity of *liquidambar styraciflua* l. Leaf essential oil. *Industrial Crops & Products*, 138, 1-8. doi:10.1016/j.indcrop.2019.06.009
- Martínez-Muñoz, O. I., Ospina-Giraldo, L.F., Mora-Huertas, C.E. (2020). *Nano- and micro-encapsulation - techniques and applications*: IntechOpen.
- Melo, A. P. Z., Rosa, C.G., Sganzerla, W.G., Nunes, M.R., Noronha, C.M., Oliveira, M.V., . (2019). Synthesis and characterization of zein nanoparticles loaded with essential oil of "ocimum gratissimum" and "pimenta racemosa". *Materials Research Express*, 1-15. doi:10.1088/20531591/ab2fc1
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & function*, 5, 1113-1124. doi:10.1039/c3fo60702j
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T.P., Wuttke, S. (2019). Nanoparticle characterization: What to measure? *Advanced Materials*, 31(1901556), 1-26. doi:10.1002/adma.201901556
- Mourdikoudis, S., Pallares, R.M., Thanh, T.K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *The Royal Society of Chemistry*, 10, 12871–12934. doi:10.1039/c8nr02278j
- Mullarney, M. P., Beach, L.E., Dave, R.N., Langdon, B.A. (2011). Applying dry powder coatings to pharmaceutical powders using a comil for improving powder flow and bulk density. *Powder Technology*, 212, 397–402. doi:10.1016/j.powtec.2011.06.008
- Nalbantsoy, A., Karış, M., Karakaya, L., Akgül, Y. (2016). Antioxidant, cytotoxic and inos activity of liquidambar orientalis mill. Resin extracts. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3), 198-205. doi:10.1515/tjb-2016-0030
- Nayak, B. K., Nanda, A., Bhat, M.A. (2016). *Integrating biologically-inspired nanotechnology into medical practice*. United States of America: IGI Global.

- Noronha, C. M., Granada,A.F.,Carvalho,S.M. (2013). Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops and Products*, 50, 896– 903. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.015
- Okmen G, T. O., Ceylan O, Gork G. (2014). The antimicrobial activity of *Ilquidambar orientalis mill.* Against food pathogens and antioxidant capacity of leaf extracts. *Afr J Tradit Complement AlternMed*, 11(5), 28-32. doi:10.4314/ajtcam.v11i5.4
- Oskay, M., Sarı,D. (2007). Antimicrobial screening of some turkish medicinal plants,. *Pharmaceutical Biology*, 45(3), 176-181. doi:10.1080/13880200701213047
- Ozdemir, M. (2022). *Encapsulation of hazelnut skin extract and using encapsulated microcapsules in mayonnaise as antioxidant* (Master of science), Akdeniz University, Antalya.
- Özlük, A. A., Oytun,M.G.,Günenç,D. (2017). Kanser immünoterapisi. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 2(1), 21-23. doi:10.5606/fng.transplantasyon.2017.004
- Pal, S. L., Jana, U., Manna,P.K., Mohanta, G.P., Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(06), 228-234.
- Pandey, S. K., Patel, D.K., Thakur, R., Mishra, D.P., Maiti, P., Halder, C. (2015). Anti-cancer evaluation of quercetin embedded pla nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 521–529. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.011
- Pascoli, M., Lima,R., Fraceto,L.F. (2018). Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. *Frontiers in Chemistry*, 6(6). doi:10.3389/fchem.2018.00006
- Patel, A. R., Patricia,C.M., Heussen, J.H., Drost, E., . (2012). Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food chemistry*, 423-429. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.054
- Patle, T. K., Shrivastava,K., Kurrey,R., Upadhyay,S., Jangde, R. (2020). Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in dillenia pentagyna using uv–vis and ftir spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 242(118717), 1-10. doi:10.1016/j.saa.2020.118717

- Podaralla, S., Perumal, O. (2010). Preparation of zein nanoparticles by ph controlled nanoprecipitation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6, 312-317. doi:10.1166/jbn.2010.1137
- Popiolski, T. M., Otsuka,I., Halila,S., Muniz,E.C., Soldi,V., Borsali, R. (2016). Preparation of polymeric micelles of poly(ethylene oxide-b-lactic acid) and their encapsulation with lavender oil. *Materials Research.*, 19(6), 1356-1365. doi:10.1590/1980-5373-MR-2016-0430
- Rajic, D., Spasojević,L.,Cvjetković,V.G.,Bučko,S.,Fraj,J. (2021). Zein– resin composite nanoparticles with coencapsulated carvacrol. *food Processing and Preservation*, 46(15741), 1-10. doi:10.1111/jfpp.15741
- Ramanujam, R., Sundaram,B., Janarthanan,G. (2018). Biodegradable polycaprolactone nanoparticles based drug delivery systems: A short review. *BIOSCIENCES BIOTECHNOLOGY RESEARCH ASIA.*, 15, 679-685. doi:10.13005/bbra/2676
- Raza, A., Hayat,U., Bilal,M., Iqbal,H.M.N., Wang,J. (2020). Zein-based micro- and nano-constructs and biologically therapeutic cues with multi-functionalities for oral drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(101818), 1-12. doi:10.1016/j.jddst.2020.101818
- Re, R., Pellegrini,N., Proteggente,A.,Pannala,A., Yang,M. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.*, 26(9/10), 1231–1237.
- Rocha, L., Merat,LC., Menezes,LR. (2020). Extract of curcuminoids loaded on polycaprolactone and pluronic nanoparticles: Chemical and structural properties. *Applied Nanoscience*, 10, 1141–1156. doi:10.1007/s13204-019-01197-w
- Rosa, C., Maciel,MVOB., Carvalho,S.M. (2015). Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 337–344. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.05.019
- Saad, W., Prudhomme,RK.,. (2016). Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today*, 11, 212-227. doi:10.1016/j.nantod.2016.04.006

- Sağdıç, O., Özkan, G., Özcan, M., Özçelik, S. (2005). A study on inhibitory effects of *La tree (liquidambar orientalis mill. Var. Orientalis)* storax against several bacteria. *Phytotherapy Research*, 19, 549–551. doi:10.1002/ptr.1654
- Sahin-Nadeem, H., Özen, M. (2014). Physical properties and fatty acid composition of pomegranate seed oil microcapsules prepared by using starch derivatives/whey protein blends. *European journal of lipid science and technology*, 116(7), 847-856. doi:10.1002/ejlt.201300355
- Şahin-Nadem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A., Özdemir, F. (2013). Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*salvia fruticosa miller*) by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 52, 31-38. doi:10.1016/j.lwt.2013.01.007
- Salari, N., Darvishi, N., Shohaimi, S., Bartina, Y., Ahmadipanah, M. (2022). The global prevalence of peptic ulcer in the world: A systematic review and meta-analysis. *Indian Journal of Surgery*, 84(5), 913-921. doi:10.1007/s12262-021-03189-z
- Sanna, V., Siddiqui, A., Sechi, M. (2013). Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol) blend for prostate cancer treatment *Molecular Pharmaceutics* (pp. 1-45). American Chemical Society.
- Saraç, N., Şen, B. (2014). Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *liquidambar orientalis mill. Var. Orientalis*. *Industrial Crops and Products*, 53, 60-64. doi:10.1016/j.indcrop.2013.12.015
- SCENIHR (2021). *Plenary meeting of the advisory group on the food chain and animal and plant health*. Retrieved from Brussels: [https://food.ec.europa.eu/system/files/2018-05/adv\\_grp\\_plenary\\_20180427\\_pres\\_09c.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2018-05/adv_grp_plenary_20180427_pres_09c.pdf)
- SCENIR (2009). *Opinion on the appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the technical guidance documents for new and existing substances for assessing the risk of nanomaterials*. Retrieved from Brussels: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihr/docs/scenihr\\_o\\_023.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_023.pdf).

- Shishir, M. R. I., Xie,L., Zheng,X., Chen,W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.018
- Siegel, R. L., Miller,K.D.,Wagle,N.S.W.,Jemal,A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73, 17-48. doi:10.3322/caac.21763
- Sotelo-Boyas-a, M., Correa-Pacheco, Z., Bautista-Banos, S., Gomez y Gomez, Y. (2017). Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 409–414. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.063
- Sotelo-Boyas-b, M. E., Correa-Pacheco, Z.N., Bautista-Banos, S., Corona-Rangel, M.L. (2017). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 15-20. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.022
- Sung, H., Ferlay,J.,Siegel,R.L.,Laversanne,M. (2021). Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71, 209–249. doi:10.3322/caac.21660
- Suzek, H., Celik, I., Dogan, A., Yildirim, S. (2015). Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(3), 451–457. doi:10.3109/13880209.2015.1045086
- Tanker, M., Sayron, E. (1974). *Styrax liquidus* üzerine farmakognozik araştırmalar. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 4(108), 111-148.
- Tao, J., Chow,SF.,Zheng,Y. (2019). Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1, 4-18. doi:10.1016/j.apsb.2018.11.001
- Tavares, W., Pena, GR., MARTin-Pastor,M. (2021). Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and

- antibacterial activities. *Journal of Molecular Liquids*, 341. doi:10.1016/j.molliq.2021.116915
- Teker, N. (2013). *Sığla ağacı (liquidambar orientalis mill.) yağının bileşiminin belirlenmesi, karakterizasyonu ve bazı bileşenlerinden kokulu türevlerin sentezlenmesi*. (Master of science Thesis), Trakya University, Trakya, Turkey.
- Thankappan, D. A., Raman, H. K., Jose, J., Sudhakaran, S. (2020). Plant-mediated biosynthesis of zein–pectin nanoparticle: Preparation, characterization and in vitro drug release study. *Journal of King Saud University – Science*, 32, 1785–1791. doi:10.1016/j.jksus.2020.01.017
- TSE. (1963). Standard for styrax oil. (*Türk Standartları Enstitüsü*) *Standart Ekonomik ve Teknik Dergi*, 2(24).
- Türker, İ., Koç, B., İşleroğlu, H. (2018). Püskürtmeli-dondurarak kurutma işleminin maltodekstrinin fiziksel özellikleri üzerine etkisi. *The journal of food*, 43(2), 197-210. doi:10.153237/gida.GD17101
- Ulusoy, H., Ceylan,Ş., Peker, H. (2021). Determination of antioxidant and antimicrobial activity of sweetgum (liquidambar orientalis) leaf, a medicinal plant. *Polimeros*, 31(2), 1-7. doi:10.1590/0104-1428.04221
- Usta, A. (2020). *Sıçanlarda random deri flebi yaşayabilirliğine sığla yağının etkisinin araştırılması*. (Uzmanlık), Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- Velioğlu, E., Kandemir, G., Tayanç, Y., Çengel, B., Alan, M., Kaya, Z. (2008). *Türkiye'deki sığla (liquidambar orientalis miller) popülasyonlarının genetik yapısının moleküler belirteçlerle belirlenmesi ve koruma stratejileri geliştirilmesi*. Ankara-Türkiye: Orman ağaçları ve tohumları ıslah araştırma müdürlüğü.
- Weatherburn, M. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, 39(8), 971-974.
- Xing, M., Zhao,H.,aHMED,r., wANG,x. (2022). Fabrication of resveratrol-loaded zein nanoparticles based on flash nanoprecipitation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 654, 129829. doi:10.1016/j.colsurfa.2022.129829
- Yang, J., Lin,J., Chen,X., Rong,L., Rong,L.Shen,M. (2022). Mesona chinensis polysaccharide/zein nanoparticles to improve the bioaccessibility and in vitro

bioactivities of curcumin. *Carbohydrate Polymers*, 295(119875), 1-11. doi:10.1016/j.carbpol.2022.119875

- Yao, K., Chen, W., Song, F., McClements, D. J., Hu, K. (2018). Tailoring zein nanoparticle functionality using biopolymer coatings: Impact on curcumin bioaccessibility and antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 79, 262-272. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.12.029
- Ye, W., Zhu, F., Cai, Y., Wang, L., Zhang, G., Zhao, G., Chu, X., Shuai, Q., Yan, Y. . (2022). Improved paclitaxel delivery with peg-b-pla/zein nanoparticles prepared via flash nanoprecipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 486–495. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.021
- Zhang, Y., Wang, B., Wu, Y., Gao, B. (2019). Fabrication and characterization of zein composite particles coated by caseinate-pectin electrostatic complexes with improved structural stability in acidic aqueous environments. *Molecules*, 24(2535), 1-14. doi:10.3390/molecules24142535
- Ziaee, A., Albadarin, A. B., Padrela, L., Femmer, T., O'reilly, E., Walker, G. (2019). Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 127, 300-318. doi:10.1016/j.ejps.2018.10.026
- Zou, T., Li, Z., Percival, S. S., Bonard, S., Gu, B. L. (2012). Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 27, 293-300. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.10.002



## ÖZ GEÇMİŞ

**Soyadı, Adı:** ÜLKERYILDIZ BALÇIK, Eda

**Yabancı Dil:** İngilizce

### EĞİTİM

| Derece        | Kurum                             | Bölüm                          | Mezuniyet Tarihi (Yıl) |
|---------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Doktora       | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | Gıda Mühendisliği              | 2024                   |
| Yüksek Lisans | İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü  | Kimya Mühendisliği (İngilizce) | 2013                   |
| Lisans        | Ege Üniversitesi                  | Kimya Mühendisliği (İngilizce) | 2010                   |

### BURSLAR ve ÖDÜLLER

- 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Bursu, TÜBİTAK, (Proje no: 110M104) (2011-2013)
- 100/2000 Yök Doktora Bursu (2018-2023)
- BİDEB-2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı Bursu, TÜBİTAK (2023-2024)
- 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Bursu, TÜBİTAK (Proje no: 221O107) (2021-2024)

## AKADEMİK ÇALIŞMALAR

### 1. PROJELER

- ‘Nano’ Kalsit( $\text{CaCO}_3$ ) Üretimi., TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje No: 110M104, Yürütücü: Ekrem ÖZDEMİR, Bursiyer: Eda ÜLKERYILDIZ BALÇIK, 2011-2013 (Ulusal)
- Sığla (*Liquidambar orientalis*) yağının mikro- ve nanoenkapsülasyonu: optimum koşullarda üretilen partiküllerin karakterizasyonu, in vitro statik model sindirim ortamlarında salınımı, antiülserojenik, antikarsinojenik etkileri, depolama stabilitesi ve model gıda uygulamaları., TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje No: 221O107, Yürütücü: Mehmet TORUN, Bursiyer: Eda ÜLKERYILDIZ BALÇIK, 2021-2024 (Ulusal).
- Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) yağının farklı polimerler kullanılarak flaş nanoçöktürme (flash nanoprecipitation) yöntemiyle nanoenkapsülasyonu, karakterizasyonu, depolama stabilitesi belirlenmesi ve model gıda uygulamaları, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Mehmet TORUN, Araştırmacı: Eda ÜLKERYILDIZ BALÇIK, 2023-2024 (Ulusal).

### 2. MAKALELER

1. Ülkeryıldız, E., S. Kılıç, and E. Özdemir, (2016) Rice-like hollow nano- $\text{CaCO}_3$  synthesis. *Journal of Crystal Growth*, 450: p. 174-180 Doi: 10.1016/j.jcrysgro.2016.06.032
2. Ülkeryıldız, E., S. Kılıç, and E. Özdemir, (2017) Nano- $\text{CaCO}_3$  synthesis by jet flow. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 512: p. 34-40 Doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.10.037.
3. Baysan, U., Bastioğlu, A. Z., Coşkun, N. Ö., Takma, D. K., Ülkeryıldız Balçık, E., Şahin-Nadeem, H., & Koç, M. (2021). The effect of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties. *Powder Technology*, 384, 332-341.
4. Konuk Takma, D., Ülkeryıldız Balçık, E., Baysan, U., Zungur Bastioğlu, A., Coşkun, N. Ö., Şahin Nadeem, H., & Koç, M. (2022) Encapsulation and *in vitro* evaluation of phenolic compounds of propolis by spray and freeze drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, e17047.

5. Konuk Takma, D., Ülkeryıldız Balçık, E., & Sahin-Nadeem, H. (2021). Physicochemical and sensory properties of gluten-free cupcakes added with fig seeds pomace flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(7), e15619.
6. Ülkeryıldız Balçık, E., M. Torun, and H.Ş. Nadeem, (2020) Gıda atıklarından aktif karbon üretimi ve aktif karbonun gıda endüstrisinde uygulamaları. *GIDA/The Journal of FOOD*, 45(2): p.217-229 Doi: 10.15237/gida.GD19127.
7. Yüksel, N., Ülkeryıldız Balçık, E., Deniz, Ş. D., Binat, Z., Boyacıoğlu, O. (2020). Aydın'ın Değerlerinden Biri Olan Kestane Meyvesinin Önemi. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(1), 162-166. (Derleme Makale) (Yayın No: 6299205)

## BİLDİRİLER

### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- 25-29 Haziran 2012 (Uluslararası) - **8. Nano-TR Kongresi** (Ankara) "A Mechanism Proposed for Nano Calcite Production" - "Nano boyutta kalsit üretimi için bir mekanizma önerisi" (Tam Metin Bildiri/Poster).
- 3-5 Eylül 2013 (Uluslararası) - **1. International Porous Powders Materials Symposium** (İzmir) "Method development in nano calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) synthesis" - "Nano kalsit sentezinde method geliştirme" adlı sunum (Tam Metin Bildiri/Poster).