

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİMOL YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN
OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Muhammet Ali ÇAKIR

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

Ağustos, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİMOL YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN
OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Muhammet Ali ÇAKIR tarafından hazırlanan tez çalışması 19.08.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Filiz ALTAY, Üye

İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Necattin Cihat İÇYER, Üye

Muş Alparslan Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan timol yüklü kitosan nanopartiküllerin optimizasyonu ve karakterizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Muhammet Ali ÇAKIR

İmza



Aileme

ve

canım anneme

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlama ve tamamlama sürecinde bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen kıymetli danışmanım Sayın Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK'e; bilgi, birikimi ve sonsuz desteğinden dolayı İTÜ Gıda Mühendisliği bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Filiz ALTAY LOKUMCU hocama ve Sayın Prof Dr. Osman SAĞDIÇ'a, teşekkürlerimi sunarım. YTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyelerine; Muş Alparslan Üniversitesi Dr. Öğr. Üyesi N. Cihat İÇYER'e teşekkür ederim. Bölümümüz Arş. Gör. Fatih BOZKURT'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez çalışmam sırasında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen tüm YTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü araştırma görevlilerine ve lisansüstü öğrencilerine de teşekkür ederim. En büyük destekçilerim aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Muhammet Ali ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	7
2 KURUMSAL TEMELLER	9
2.1 Nanoteknoloji.....	9
2.2 Enkapsülasyon	10
2.3 Nanoenkapsülasyon	12
2.3.1 Nanoenkapsülasyon Tekniklerinin Sınıflandırılması	15
2.4 İyonik Jelasyon	23
2.4.1 Duvar Materyali Olarak Kitosan	25
2.4.2 Çekirdek Materyali Olarak Timol	26
2.5 Deneysel Tasarım.....	27
2.5.1 Faktöriyel Tasarım	28
2.5.2 Kısmi Faktöriyel Deneysel Deneme Tasarımı.....	29
3 MATERYAL VE METOT	30
3.1 Materyal.....	30
3.2 Metot	30
3.2.1 Optimizasyon Parametrelerinin Belirlenmesi.....	30
3.2.2 Deneysel Tasarım	32
3.2.3 Timolün İyonik Jelasyon Yöntemiyle Nanoenkapsülasyonu.....	33
3.2.4 Partikül Büyüklüğü ve Zetapotansiyel Ölçümleri.....	37
3.2.5 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)	39
3.2.6 Antioksidan Aktivitenin (AOA) Belirlenmesi	41
3.2.7 Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	42
3.2.8 <i>In vitro</i> Salım	43

3.2.9 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	44
3.2.10 Raman Spektroskopisi Analizi	44
3.2.11 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	44
3.2.12 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	44
3.2.13 Verim Yüzdesi (YP) ve Şişme İndeksi (SI)	44
3.2.14 İstatistiksel Analiz	45
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1 Optimizasyon Parametrelerinin Belirlenmesi.....	47
4.1.1 KS ve TPP Oranının Belirlenmesinde Kullanılan I. Deneme Tasarımı	49
4.1.2 Kitosan ve TPP Oranının Belirlenmesinde Kullanılan II. Deneme Tasarımı	57
4.2. Timol Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin (TKNP) Eldesi İçin Deneysel Tasarım	68
4.2.1 Nanoenkapsülasyon Parametrelerinin Enkapsülasyon Etkinliği (%) Üzerine Etkisi	70
4.2.2 Nanoenkapsülasyon Parametrelerinin Partikül Boyutu (nm) Üzerine Etkisi	78
4.2.3 Nanoenkapsülasyon Parametrelerinin Zetapotansiyel (mV) Üzerine Etkisi	94
4.3 Parametrelerin Optimizasyonu ve Tasarımın Doğrulanması	98
4.4 Optimum Koşullarda Üretilen TKNP'lerin Karakterizasyonu	100
4.4.1. Partikül Boyutu ve Zetapotansiyel	101
4.4.2. Enkapsülasyon Etkinliği, Şişme İndeksi ve Partikül Verimi	104
4.4.3. Antibakteriyel Aktivite	105
4.4.4. Antioksidan Aktivite (AOA)	110
4.4.5. <i>In vitro</i> salım	113
4.4.6. FTIR ve RAMAN profili	115
4.4.7. SEM	118
4.4.8. DSC	119
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKÇA	126
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	139

SİMGE LİSTESİ

k	Boltzman sabiti
rpm	Dakikada Dönme Hızı
λ	Dalgaboyu
°C	Derece Santigrat
D	Difüzyon katsayısı
D_0	Gerçek difüzyon sabiti
g	Gram
L	Litre
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
N	Normalite
$\cap$	Ortamın viskozitesi
dh	Partiküllerin hidrodinamik çapı
$\emptyset$	Partiküllerin ortamdaki hacim kesri
T	Sıcaklık
α	Viral difüzyon sabiti
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devleti
AOA	Antioksidan Aktivite
BB	Biyoaktif Bileşen
CD	Siklodekstrin
DD	Deasetilasyon Derecesi
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DPPH	2,2 difenil-1-pikrilhidrazin
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ENM	Mühendislik Ürünü Nanomalzemeler
FD	Faktöriyel Dizayn
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GRAS	Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
HMW	Yüksek Molekül Ağırlığı
KNP	Kitosan Nanopartikülü
KS	Kitosan
LMW	Düşük Molekül Ağırlığı
MMW	Orta Molekül Ağırlığı
MCT	Orta Zincirli Trigliserit
MW	Molekül Ağırlığı
TKNP	Timol Yüklü Kitosan Nanopartikülü
T80	Tween 80
ZP	Zetapotansiyel

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	A) Mikrokapsül morfolojisinin (B) Nanoküre ve nanokapsülün şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.2	Biyoaktif bileşiklerin nanoenkapsülasyonunun faydaları.....	16
Şekil 2.3	Polimerik, doğal ve ekipman bazlı yöntemlerle nanoenkapsüle edilmiş biyoaktif bileşiklerin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.4	Nanoenkapsülasyonda yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımın şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.5	Gıda biyoaktif bileşenleri ve nutrasötikler için geçerli olan farklı nanoenkapsülasyontechniklerinin sistematik bir sınıflandırması.....	19
Şekil 2.6	(a) Kitosan içerisinde yer alan biyoaktif bileşen damlacıkları, (b) Biyoaktif bileşik yüklü kitosan partikülleri ve (c) TPP ile iyonik olarak çapraz bağlanan kitosanın kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.7	Düşük molekül ağırlıklı kitosan (LMW) molekül yapısı.....	26
Şekil 2.8	(A) Timolün kristal formu ve (B) Timolün kimyasal yapısı	27
Şekil 2.9	Kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı modelinde örnek grafiksel gösterimi.....	29
Şekil 3.1	Timolün iyonik jelasyon yöntemiyle nanoenkapsülasyonun şematik gösterimi.....	35
Şekil 3.2	Emülsifikasyon-iyonik jelasyon yöntemi ile TKNP'lerin formülasyonu, optimizasyonunu ve karakterizasyonunun şematik gösterimi.....	36
Şekil 3.3	Timolün kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 3.4	<i>in vitro</i> salım ortamı	43
Şekil 4.1	Kitosan partiküllerinin agregasyonu	50
Şekil 4.2	I. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerinin boyutuna(nm) etkisi.....	53
Şekil 4.3	I. deneme tasarımında kullanılan, KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin PDI'si üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.4	I. deneme tasarımında kullanılan, KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin zetapotansiyel (mV) üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.5	II. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) boyut (nm) üzerine olan etkisi.....	61
Şekil 4.6	II. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) zetapotansiyel (mV) üzerine olan etkisi...63	
Şekil 4.7	II. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) PDI değeri üzerine olan etkisi	66

Şekil 4.8 EE için KS (X2) ve TPP (X5) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi.....	72
Şekil 4.9 EE için timol (X3) ve T80 (X4) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi.....	75
Şekil 4.10 Boyut için, sıcaklık derecesi (X1) ve KS (X2) konsantrasyonu arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi.....	81
Şekil 4.11 Boyut için KS (X2) ve T80 (X4) arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi.....	85
Şekil 4.12 Boyut için; KS (X2) ve TPP (X5) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi.....	88
Şekil 4.13 Boyut için, T80 (X4) ve TPP (X5) arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi.....	91
Şekil 4.14 Nanoenkapsülasyon prosesinde zetapotansiyeli (mV) etkileyen parametrelerin etkileşimleri.....	96
Şekil 4.15 KNP ve TKNP'lerin titrasyon grafiği	103
Şekil 4.16 TKNP ve KNP'lerin oluşturduğu büyüme inhibisyonu örnekleri	107
Şekil 4.17 TKNP'nin %1 ve %2'lik seviyelerinin <i>Salmonella</i> Typhimurium'un besiyerindeki gelişimine etkisi	108
Şekil 4.18 TKNP'nin %1 ve %2'lik seviyelerinin <i>L. monocytogenes</i> 'in besiyerindeki gelişimine etkisi	109
Şekil 4.19 Farklı konsantrasyonlardaki TKNP'lerin DPPH'in koyu menekşe rengine meydana getirdiği açılma.....	110
Şekil 4.20 TKNP(A), KNP(B), Timol (C) ve Trolox (D) 'un IC50 değerlerinin hesaplanması için çizilen kalibrasyon grafikleri	111
Şekil 4.21 Troloks, timol, KNP ve TKNP'lerin IC50 değerleri.....	112
Şekil 4.22 pH 7,4 (PBS tampon çözeltisi) ortamında TKNP'lerin <i>in vitro</i> salım profili.....	113
Şekil 4.23 pH 3 (asetat tampon çözeltisi) ortamında TKNP'lerin <i>in vitro</i> salım profili.....	114
Şekil 4.24 TKNP, KNP ve timolün FTIR spektrumları	115
Şekil 4.25 (a) Timol, (b) TKNP ve (c) KNP'lerinin Raman spektrumları.....	117
Şekil 4.26 KNP'lerin (A) ve TKNP'lerin (B ve C) SEM görüntüleri	118
Şekil 4.27 Timol, KNP ve TKNP'lerin DSC termogramları.....	119

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Gıda bileşenleri ve nutrasötiklere uygulanan nanoenkapsülasyon tekniklerinin sınıflandırılması	21
Tablo 2.2 Gıda katkı maddelerinin kapsüllenmesinde kullanılan bazı biyopolimer örnekleri (duvar malzemeleri)	25
Tablo 3.1 KNP'lerin eldesinde kullanılan ön denemeler	31
Tablo 3.2 TKNP'lerin eldesinde sabit tutulan ve etkisi incelenen parametreler ile oranları	32
Tablo 3.3 Timolün nanoenkapsülasyonda kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı kullanılarak belirlenen deneme noktaları	33
Tablo 4.1 I. deneme tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.....	50
Tablo 4.2 I. deneme tasarımı ile elde edilen nanopartiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri.....	51
Tablo 4.3 I. deneme tasarımında partikül boyutu (nm) üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu	52
Tablo 4.4 I. deneme tasarımında PDI değeri üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu	54
Tablo 4.5 I. deneme tasarımında zetapotansiyel üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu	56
Tablo 4.6 II. deneme tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.....	58
Tablo 4.7 II. deneme tasarımı ile elde edilen nanopartiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri.....	59
Tablo 4.8 II. deneme tasarımında partikül boyutu (nm) üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu	60
Tablo 4.9 II. deneme tasarımında seçilen bağımsız değişkenlerin zetapotansiyel (mV) üzerine etkisini gösteren ANOVA tablosu.....	62
Tablo 4.10 II. deneme tasarımında PDI üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu	65
Tablo 4.11 İyonik jelasyon yöntemiyle nanopartikül eldesi için oluşturulan genel faktöriyel dizayn deneme tasarım planına göre belirlenen faktörler ve seviyeleri.....	68
Tablo 4.12 İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin boyut zetapotansiyel ve enkapsülasyon etkinlik değerlerinin oluşturulan faktöriyel dizayn deneme tasarımında gösterimi.....	69
Tablo 4.13 Enkapsülasyon etkinliği (%) sonuçlarına göre ANOVA tablosu	70
Tablo 4.14 Boyut (nm) sonuçlarına göre ANOVA tablosu	78

Tablo 4.15	Zetapotansiyel (mV) sonuçlarına göre ANOVA tablosu	94
Tablo 4.16	TKNP'lerin optimize edilmiş formülasyonları	99
Tablo 4.17	İyonik jelasyon yöntemi kullanılarak optimize edilen formülasyonun doğrulanması ve farklı biyoaktif bileşenlerle yüklü kitosan nanopartiküllerin bazı fizikokimyasal özellikleri ile kıyaslanması ...	100
Tablo 4.18	KNP ve TKNP'nin boyut (nm), polidispersite indeksi (PDI), Zetapotansiyel (mV) değerleri	101
Tablo 4.19	TKNP'lerin kapsülleme verimliliği (EE), Şişme indeksi (SI) ve partikül verimi (YP)	104
Tablo 4.20	KNP ve TKNP'lerin antibakteriyel aktiviteleri	106
Tablo 4.21	TKNP ve KNP'lerin farklı seviyelerinin (%1 ve %2) <i>Salmonella</i> Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal etkisi.	107
Tablo 4.22	TKNP ve KNP'lerin farklı seviyelerinin (%1 ve %2) <i>L.monocytogenes</i> karşı antimikrobiyal etkisi.....	108

Timol Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Optimizasyonu Ve Karakterizasyonu

Muhammet Ali ÇAKIR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

Timol, çeşitli kekik türlerinden elde edilen uçucu yağların majör bileşenlerinden birisi olan, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gibi önemli fonksiyonel özellikler gösteren biyoaktif bir moleküldür. Timolün suda çözünür olmaması, gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanımını kısıtlayan en önemli etkindir. Bu çalışmada, timolün kitosan (KS) kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile nano ölçekte enkapsülasyon koşulları optimize edilmiş ve optimum koşullarda elde edilen timol yüklü kitosan nanopartikülleri (TKNP) karakterize edilmiştir. Çalışmanın birinci aşamasında; sıcaklık (25-45 °C) ve KS (3-6 mg/mL), timol (3-6 mg/mL), Tween 80 (T80, 3-6 mg/mL) ve tripolifosfat (TPP, 0,15-0,75 mg/mL) konsantrasyonu olmak üzere iyonik jelleşme ile enkapsülasyon sırasında uygulanan 5 proses parametresi, faktöriyel dizayn (FD) yöntemi uygulanarak optimize edilmiştir. Optimizasyonda, düşük partikül çapı, sıfırdan uzak zetapotansiyel (ZP) ve yüksek enkapsülasyon etkinliği (EE) hedeflenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında, optimum proses parametreleri 42 °C sıcaklık, 3 mg/mL KS oranı, 5,9 mg / mL timol oranı, 3 mg/mL T80 oranı ve 0,75 mg / mL TPP oranı olarak belirlenmiştir.

Bu noktada üretilen TKNP'nin EE, ZP ve ortalama partikül çapı sırasıyla % 64,1, 35,5 mV ve 317,4 nm olarak bulunmuştur. Çalışmanın ikinci aşamasında ise optimum koşullarda üretilen TKNP ayrıntılı olarak karakterize edilmiş ve SEM, DSC, RAMAN, FTIR, antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri ile *in vitro* salım şartları belirlenmiştir. FTIR ve Raman ölçümleri ile KNP'lere timol yüklenmesi sonucu TKNP oluşumundaki moleküler etkileşimleri işaret eden yeni piklerin ortaya çıkışı ve bu piklerin alanlarında meydana gelen artış gözlemlenmiştir. SEM analizlerinde, timol eklenmesiyle nanopartiküllerin boyutunun genişlediği görülmüş ve TKNP'ler 200-590 nm arasında küresel bir şekil göstermişlerdir. TKNP'ler (IC₅₀=0,55 mg/mL) ve saf timolün (IC₅₀=0,747 mg/mL) DPPH radikal yakalama aktiviteleri karşılaştırıldığında, kapsüllenme işlemiyle timolün antioksidan aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. TKNP'ler en yüksek antibakteriyel etkiyi *Listeria monocytogenes* üzerinde gösterirken, en düşük etki *Staphylococcus aureus* üzerinde gözlemlenmiştir. KNP'ler için ise tam tersi sonuçlar elde edilmiştir. Sıvı besiyeri dilüsyon metodunda, TKNP ve KNP'ler 24 saatte bakteri sayılarında istatistiksel olarak önemli (P<0.05) azalmalar sağlarken, TKNP'lerin %2'lik (v/v) seviyesini içeren ortamlarda *L. monocytogenes* sayısı 24 saat sonunda tespit limitinin altında bulunmuştur. Asetat tamponunda (pH 3), fosfat tamponuna (pH 7,2) göre daha yavaş aktif madde salımı meydana gelmiştir. Şişme indeksi ve partikül verimi sırasıyla % 6,7±0,3, ve % 30,8±2,76 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma ile düşük partikül çapına sahip, suda çözünabilir, kontrollü salım yapan ve yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösteren TKNP'ler yüksek verimde üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanoenkapsülasyon, timol, kitosan nanopartikülü, iyonik jelasyon, nanoteknoloji

Optimization and Characterization of Thymol Loaded Chitosan Nanoparticles

Muhammet Ali ÇAKIR

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih TÖRNÜK

Insolubility of thymol in water is the most important factor limiting its use as an additive in the food industry. In this study, conditions of the nano scale encapsulation of thymol using chitosan (CS) by ionic gelation method were optimized and the thymol loaded chitosan nanoparticles (TCNPs) obtained under optimum conditions were characterized. In the first stage of the study; 5 process parameters namely temperature (25-45 °C) and concentrations of CS (3-6 mg/mL), thymol (3-6 mg/mL), Tween 80 (T80, 3-6 mg/mL) and tripolyphosphate (TPP, 0.15-0.75 mg/mL) applied during the encapsulation with ionic gelation were optimized by using the factorial design (FD) method. The lowest particle diameter, zetapotential (ZP) far from zero and the highest encapsulation efficiency (EE) were aimed during the optimization. At optimization studies, the optimum process parameters were determined as 42 °C temperature, 3 mg/mL CS ratio, 5.9 mg/mL thymol ratio, 3 mg/mL T80 ratio and 0.75 mg/mL TPP ratio. The EE, ZP and average particle diameter of the TCNP produced at this point were

found to be 64.1%, 35.5 mV and 317.4 nm, respectively. In the second stage of the study, the TCNP produced under optimum conditions was characterized in detail and SEM, DSC, RAMAN, FTIR, antibacterial and antioxidant activities as well as *in vitro* release conditions were determined. The incidence of new peaks indicating the molecular interactions during the formation of the TCNPs and the increase in the peak densities were observed with FTIR and Raman measurements. In SEM analyzes, it was observed that the size of the nanoparticles expanded with the addition of thymol, and the TCNPs showed a spherical shape between 200-590 nm diameter. When comparing the DPPH radical scavenging activities of the TCNPs (IC₅₀ = 0.55 mg/mL) and pure thymol (IC₅₀ = 0.747 mg/mL), it was observed that the antioxidant activity of thymol increased with the encapsulation process. The lowest antibacterial effect of the TCNPs was observed on *Staphylococcus aureus* while they showed the highest effect on *Listeria monocytogenes*, In the case of CNPs, the opposite results were obtained. TCNP and CNPs provided statistically significant ($P < 0.05$) decreases in bacterial numbers in 24 h during broth dilution method, *L. monocytogenes* numbers were below the detection limits after 24 hours in the existence of 2% (v/v) TCNPs. A slower release of the active compound at acetate buffer (pH 3) occurred as compared to the phosphate (pH 7.2). Swelling index and particle yield was found as % 6.7 ± 0.3 and % 30.8 ± 2.76 , respectively. In conclusion, water-soluble and controlled release TCNPs with low particle diameter and high antimicrobial and antioxidant activity were produced with this study.

Keywords: Nanoencapsulation, thymol, chitosan nanoparticle, ionic gelation, nanotechnology

1.1 Literatür Özeti

Günümüzde çeşitli enkapsülasyon sistemleri tasarlayarak işlevsel ve lezzetli gıdalar üretmek mümkündür. Enkapsülasyon sistemlerinde biyoaktif bileşenler, duvar veya kaplama materyali olarak adlandırılan bir materyalle ya da çeşitli malzemelerin kombinasyonu ile kaplanmaktadır. Bu sistemlerde besin bileşenlerinin stabilitesi artırılmakta ve kapsüllenmemiş olanlara kıyasla fizikokimyasal özellikleri geliştirilmektedir. Ayrıca gıda endüstrisinin halk sağlığı ile doğrudan ilişkili olması nedeniyle daha sağlıklı gıda maddelerin üretilmesi gerekmektedir. Bu açıdan son yıllarda, nutrasötiklerin tüketicilere avantajlar sağlayacak şekilde enkapsüle edilmesiyle fonksiyonel özellikleri geliştirilmiş gıda maddelerinin üretilmesine yönelik ilgi günden güne artmaktadır [1].

Nutrasötikler, beslenme ve tıp alanı ile bağlantılıdır. Bu terim ilk olarak 1979'da DeFelice tarafından kullanılmış, “sağlığa yararı olan ve hastalıkların ilerlemesini engelleyen gıda bileşenleri” olarak tanımlanmıştır [2]. Son zamanlarda esansiyel yağ asitleri (omega 3), karotenoidler (β -karoten ve likopen), vitaminler (D, tiamin, riboflavin), antioksidanlar (tokoferoller, flavonoidler, polifenolik bileşikler), fitosteroller (stigmasteroller ve sitosterol), diyet lifi (inulin), mineraller (Fe^{+2} , Mg^{+2}), biyoaktif peptitler (kazein hidrolizatları) ve biyoaktif bileşikler (karvakrol, timol) gibi farklı nutrasötikler zenginleştirilmiş sağlıklı gıdalar geliştirmek için kullanılmaktadır [3]. Sağlığa yararlarının yanı sıra antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri olan bu bileşikler gıdaların raf ömrüne de etki etmektedir. Bu özelliklerinden dolayı bu çalışmada nutrasötik, biyoaktif bileşik olan timol kullanılmıştır.

Ancak nutrasötiklerin çoğu, gıdaların yapılarına dahil edildikten sonra işleme ve depolama sırasında meydana gelen koşullara duyarlıdır. Bu açıdan, bu bileşikler farklı enkapsülasyon sistemleri kullanılarak gıdalara ilave edilmektedir [4]. Ayrıca nutrasötiklerin kapsüllenmesiyle, işleme aşamaları ve sindirim koşulları sırasında oluşabilecek hasar gibi istenmeyen değişiklikler de azaltılmaktadır. Bu nedenle, uygun bir taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi oldukça önemlidir [5,6].

Timol (2-izopropil-5-metil fenol), kekik türlerinden elde edilen esansiyel yağların ana fenolik bileşenidir ve bakteriyel proteinleri bağlayan hücre zarının parçalanmasına ve geçirgenliğine olanak sağlayan güçlü antimikrobiyal etkiye sahiptir [7,8]. Aynı zamanda güçlü antioksidan aktivite de gösterir ve Amerikan Gıda ve İlaç dairesi (FDA, Food and Drug Administration) tarafından genel olarak güvenilir kabul edilir (GRAS, Generally Recognized As Safe) [9]. Antimikrobiyal [10] ve antioksidan aktivitesi [11] nedeniyle gıdaların bozulmasını kontrol etmek ve raf ömrünü uzatmak amacıyla timol, karvakrol gibi fenolik bileşenleri içeren nüttrasötikler üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır [8,12,13]. Bu fenolik bileşikler sahip oldukları yüksek antioksidatif aktiviteleri nedeniyle gıdaların oksidasyona karşı korunmasında sentetik antioksidanlara alternatif olarak düşünülmüştür [14]. Bununla birlikte, timol sahip olduğu bu avantajlarının yanında çeşitli dezavantajlara da sahiptir. Bu dezavantajlardan biri antimikrobiyal etkisini sitoplazmik zarın depolarizasyonu ile gerçekleştiren timolün, sitoplazmik zarı depolarize etmesi için nispeten yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının gerekliliğidir [15]. Başka bir dezavantajı ise timolün suda zayıf çözünürlük göstermesidir. Bu durum timolün hem homojen dağılımını hem de patojenlerle olan temasını sınırlamaktadır. Bununla birlikte, timol ısıtıl işlem ve depolama koşullarına duyarlıdır. Ayrıca timol gıdanın organoleptik kalitesini bozan nispeten yüksek lezzet etkisi ile düşük lezzet eşiğine sahiptir. Tüm bunlar timolün gıdalarda kullanımını sınırlandırmaktadır [12]. Bu çalışmada timolün gıdalarda kullanımını sınırlandıran etmenleri ortadan kaldırmak amacıyla enkapsülasyon teknolojisi kullanılmıştır.

Nanoenkapsülasyon için kullanılan çok yönlü malzemelerden birisi kitosan (KS)'dir. KS; biyouyumluluğu, biyolojik olarak bozunabilirliği, muko yapışkanlığı ve immünojenik ve toksik olmayan doğası nedeniyle gıdalarda kullanılmak üzere nano boyutlu bileşiklerin geliştirilmesinde biyopolimer olarak yaygın olarak kullanılan ve kullanılması kapsamlı bir şekilde araştırılan bir maddedir [16]. KS, kitinin deasetilasyonu ile hazırlanan doğal bir polisakkarittir ve yukarıdaki özelliklerinden dolayı uçucu yağların kapsüllenmesinde kullanılabilen güvenilir bir madde olarak kabul görmüştür [17,18].

Nanoenkapsülasyon, hidrofobik biyoaktif bileşiklerin olumsuz koşullara karşı korunması ve biyoyararlılıklarının artırılması için uygun bir yaklaşımdır. Nanoenkapsülasyon işleminin bir başka avantajı ise biyoaktif bileşiklerin kontrollü salımını sağlamasıdır. Bununla birlikte, gıdalarda istenmeyen lezzetleri maskelemek için de kullanılmaktadır [19]. Bu açıdan timolün nanoenkapsülasyonu, gıdanın raf ömrünü uzatmanın ve fonksiyonel özelliklerini korumanın alternatif bir yolu olarak düşünülmektedir.

Mohammadi ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Zataria multiflora* esansiyel yağını, iyonik jelasyon tekniği ile kitosan nanopartikülleri (KNP) içine kapsüllemiştir. Nanoenkapsülasyon işlemi sonucunda, *Botrytis cinerea*'ya karşı gelişmiş stabilite ve yüksek antifungal aktivite tespit edilmiş ve ortalama nanopartikül büyüklüğü 125-175 nm arasında bulunmuştur [20]. Ghaderi-Ghahfarokhi ve ark. (2016)'nın yürüttüğü çalışmada kekik esansiyel yağını içeren KNP'leri elde etmek için önceden hazırlanmış yağ/su emülsiyonunda iyonik jelasyon yöntemi uygulanmıştır. Yapılan mikrobiyolojik analizlerin sonucunda, *Enterobacteriaceae* ve *Staphylococcus aureus* popülasyonunun, nanoenkapsülenmiş kekik esansiyel yağı ile muamele edilmiş burger örneklerinde önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca kekik esansiyel yağı içeren nanopartiküller, incelenen burger örneklerinde tiyobarbitürik asit reaktifinde de azalma oluşturmuştur. Nanoenkapsülasyon işleminin, kekik esansiyel yağının raf ömrünü uzattığı ve depolama başlangıcında biyoaktif bileşiklerin buharlaşmasını azalttığı saptanmıştır [21].

KNP'leri içine kapsüllenmiş serbest *Elsholtzia splendens* ekstresinin antioksidan aktivitesinin incelendiği başka bir çalışmada, antioksidan aktivitenin konsantrasyona bağlı olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, KNP'ler içinde kapsüllenmesi ile *Elsholtzia splendens* ekstresinin lipid peroksidasyon önleyici aktivitesi de önemli ölçüde artmıştır. Bu nedenle, *Elsholtzia splendens* ekstraktının KS ile kapsülleme işleminin antioksidan aktiviteyi arttırmak için uygun bir teknik olduğu bildirilmiştir [22].

Nanopartiküllerde timolün biyoaktif bileşen olarak kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda timol, kinoa proteini ile film oluşturmada kullanılmış [8], elektroegirme yöntemi ile kapsüllenmiş [23] veya siklodekstrin [24,25] ile kaplanmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda farklı kimyasallar ve/veya KS dışında ekstra duvar malzemeleri kullanılmıştır.

Bu çalışma, timolün ılımlı şartlarda, kimyasal çözücü madde kullanılmadan ve başka herhangi bir duvar malzemesine ihtiyaç duyulmadan KS ile kapsüllenmesi, enkapsülasyon koşullarının optimize edilmesi ve optimum koşullarda elde edilen nanokapsüllerin karakterize edilmesini amaçlamaktadır. Bu amaçla, bu çalışmada nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri olan iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır.

İyonik jelasyon yöntemi, KS gibi pozitif yüklü polimerler ile penta sodyum tripolifosfat (STPP) gibi polianyonlar arasındaki etkileşime dayanmaktadır. Bu etkileşim KS ile STPP arasında oluşan çapraz bağlanma ile sonuçlanmaktadır [26]. İyonik jelasyon yöntemi ile yüksek sıcaklık dereceleri ve organik çözücüler kullanılmadan daha ılımlı koşullarda nanopartiküller sentezlenebilmektedir [27,28].

Literatür çalışmaları incelendiğinde, iyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen biyoaktif bileşenlerle yüklü nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutunu ve zetapotansiyelini etkileyen parametreleri inceleyen sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmıştır [29–32].

Bu açıdan, timolün iyonik jelasyon yöntemiyle nanoenkapsülasyona etki eden parametrelerin (sıcaklık derecesi, çekirdek, duvar materyali, yüzey aktif madde, çapraz bağlayıcı ajan konsantrasyonu) ve bu parametrelerin etkileşiminin enkapsülasyon etkinliği (%), zetapotansiyel (mV) ve partikül boyutu(nm) üzerine olası etkilerinin incelenmesi ile literatüre katkıda bulunulacaktır.

Bu çalışmada, timol yüklü kitosan nanopartiküllerinin (TKNP) üretim koşullarının optimize edilmesinde deneysel tasarım olarak faktöriyel dizayn (FD) kullanılmıştır. FD, deneysel parametrelerde bağımsız değişkenler ile yanıt değerleri arasındaki ilişkileri araştırmak için kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu çalışmada belirlenen parametre yanıtları deney tasarımının tüm noktalarında ayrı ayrı uygulanmıştır. Benzer deneysel tasarımlar, KNP'lerin üretim koşullarının optimizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır [33,34].

Sharma ve ark. (2019) suda çözünürlüğü ve biyoyararlılığı düşük, sınırlı terapötik etki gösteren hidrofobik ilaç olan carvedilol'ü KNP'ler içerisinde enkapsüle etmek için iyonik jelasyon yöntemini kullanmış ve KS ve TPP konsantrasyonları ile karıştırma hızının, verim ve partikül boyutu üzerine etkisini incelemek için Box-Behnken deneysel tasarımından yararlanmışlardır. Bu çalışma sonucunda carvediol yüklü KNP'lerin suda çözünürlüğü ve biyoyararlanımının arttığı sonucuna varmışlardır [33].

Bu çalışmada modifiye edilmiş iyonik jelasyon tekniği, TKNP'lerin formülasyonu için kullanılmıştır. Emülsifikasyon-iyonik jelasyon yönteminin etkisinde incelenen faktörler; Sıcaklık derecesi ile KS, timol, tween 80 (T80) ve sodyum tripolifosfat (TPP) konsantrasyonlarıdır. Ayrıca, bu çalışma timolün nanokapsülasyonu için FD ile bu parametrelerin optimizasyonuna odaklanmıştır. Optimize edilen parametrelerde üretilen TKNP'lerin karakterizasyonu yapılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Timol dahil olmak üzere bitki kaynaklı biyoaktif bileşiklerin çoğu yüksek derecede uçucu ve kararsız bir yapıya sahiptir. Ayrıca işleme ve depolama sırasında oksijene, ışığa ve ısıya duyarlıdır.

Son yıllarda, nanoenkapsülasyon tekniği ile biyoaktif bileşiklere kullanım kolaylığı, arttırılmış stabilite, oksidasyona karşı koruma, uçucu bileşenlerin tutulması, tat maskeleyme, kontrollü salım gibi özellikler kazandırılmaktadır. Ayrıca ardışık çoklu bileşenlerin verilmesi, lezzet karakteri, uzun süreli organoleptik algı, toksik yan etkilerin azalması, hidrofobik bileşenlerin suda çözünürlüğünün arttırılması ve biyoyararlılık ve fonksiyonelliğinin arttırılması gibi ek özellikler kazandırılmaktadır.

Timolün kapsüllenmesi; gıdaların raf ömrünü uzatmanın ve fonksiyonel özelliklerini korumanın alternatif bir yoludur. Literatür çalışmaları incelendiğinde, esansiyel yağdan türetilmiş biyoaktif bileşiklerin nanoboyutta KS partiküllerine yüklenmesi, üzerinde yoğun olarak çalışılan bir konudur. Literatürde bu konu ile ilgili çalışmalar bulunsa da nanoenkapsülasyon koşullarının ve üretim parametrelerinin detaylı şekilde optimizasyonuna dair oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle mevcut çalışma, esansiyel yağ türevi biyoaktif bileşiklerin KS bazlı nanopartiküller içerisine yüklenmesi ve elde edilen nanokapsüllerin karakterizasyonu üzerine odaklanmaktadır. Model biyoaktif bileşik olarak timol seçilmiştir. Bu çalışmada, su içinde yağ (y/s) emülsifikasyonu ve iyonik jelasyon olmak üzere iki aşamadan oluşan basit, ılımlı şartlar içeren ve toksik olmayan bir metot olan iyonik jelasyon ile TKNP'lerin hazırlanması amaçlanmıştır. Bununla birlikte, benzer yöntemlerle hazırlanan biyoaktif bileşen yüklü KNP'ler, genellikle belirli uygulamalarda yararlılıklarını sınırlayan geniş bir partikül boyutu dağılımı, zayıf stabilite, düşük enkapsülasyon etkinliğine sahiptir. TKNP'ler elde edilerek timolün yararlılıklarını sınırlandıran ve gıda endüstrisinde kullanımını engelleyen dezavantajlarını ortadan kaldırmak, bu çalışmanın ana hedefini oluşturmaktadır.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, biyoaktif bileşenlerin nanoenkapsülasyonu ile ilgili çalışmalar mevcut olsa da, timolün KS içerisine nano ölçekte enkapsülasyonu üzerine etki eden parametrelerin incelenmesi ve optimize edilmesiyle ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmanın birinci aşamasında; iyonik jelasyon sırasında uygulanacak sıcaklık derecesi, çekirdek, duvar materyali, yüzey aktif madde, çapraz bağlayıcı ajan konsantrasyonu gibi parametrelerin ve bu parametrelerin etkileşiminin elde edilecek nanokapsüllerin enkapsülasyon etkinliği (%), zetapotansiyel (mV) ve partikül boyutu (nm) üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise; birinci aşamada optimize edilen enkapsülasyon koşulları altında üretilen TKNP'ler, ultraviyole ve görünür (UV-Vis) spektrofotometre, RAMAN spektrofotometre, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve Zetapotansiyel ölçümü ile karakterize edilmiş, ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Ek olarak, farklı pH değerlerinde nanopartiküllerden timol salımı incelenmiştir. Böylelikle, TKNP'lerin model gıda sistemlerinde kullanılabilirliğini kolaylaştıracak değerli verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Kekik bitkilerinden elde edilen uçucu yağların majör bileşenlerinden olan timol; antioksidan ve antimikrobiyal gibi birçok biyoaktif özelliğe sahip olmakla birlikte kendine has yoğun ve keskin bir tat ve kokuya sahiptir. Ayrıca suda çözünür olmaması nedeniyle gıdalarda kullanımı sınırlı olan bir fenolik bileşiktir. İyonik jelasyon tekniği, biyoaktif bileşenlerin nanoenkapsülasyonunda kullanılan alternatif yöntemlerden birisi olup hızlı ve ucuz olması, çevresel açıdan zararlı solventlerin kullanılmaması ve nanopartikül üretiminde pahalı alet ve ekipmanlara ihtiyaç duymaması gibi birçok avantaja sahiptir. Nanoenkapsülasyon ile çevresel koşullara duyarlı biyoaktif bileşenlerin stabilitelerinin artırıldığı ve özelliklerinin geliştirildiği/korunduğu, birçok çalışma ile gösterilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmanın hipotezi; iyonik jelasyon tekniği ile nanoenkapsülasyon yönteminin, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinen timol için dizayn edilmesi, yöntem parametrelerinin etkilerinin incelenmesi, enkapsülasyon etkinliği yüksek, zetapotansiyeli sıfırdan uzak ve düşük partikül boyutuna sahip TKNP'lerin üretilmesi ve elde edilen optimum özelliklere sahip olan nanopartiküllerin gıda endüstrisinde kullanımı için kritik olan birçok özelliğinin karakterize edilmesidir. Bu çalışma ile optimum nanopartikül formülasyonunun elde edilmesi, timolün suda çözünür hale getirilmesi, stabilitesinin ve fonksiyonel özelliklerinin artırılması hedeflenmiştir.



2.1 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji disiplinlerarası bir bilim dalı olup gıda sektörü de dahil olmak üzere birçok alanda sayısız uygulama alanı bulmaktadır. Nanoölçekli yapılar gıdaların depolanması sırasında onların stabilitesi, işlenebilirliği, tekstürü, lezzeti ve diğer birçok özelliği üzerinde etkili olabilmektedir [1]. Nanoteknolojinin prensibi, partikül boyutunu ortalama 1 μm altına yani nanoboyuta indirgeyerek, materyalin fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesine dayanır [35]. Farmasötik bilimlerde nanopartiküller 1000 nm'den düşük partiküller olarak tanımlanır. Son yıllarda, Amerika'da FDA ve Avrupa'daki Avrupa Birliği Komisyonu gibi yasa koyucu otoriteler, nanopartiküller ve nanomalzemeler için çeşitli tanımlamalar getirmiştir. Bununla birlikte, bu tanımlamalar tüm ticari alanlarda aynı şekilde uygulanmamaktadır. Örneğin Avrupa Birliği Komisyonu, kozmetiklerle ilgili yaptığı düzenlemede partiküllerin ortalama boyutu 100 nm ve altında ve bu boyuttaki partiküllerin, toplam partiküllerin %50 ve daha fazlasını oluşturması durumunda materyali nanopartikül olarak tanımlamaktadır. Bununla birlikte, gıda uygulamaları ile ilgili olarak 1 μm altında partiküller nanoboyutta sayılmasına rağmen, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, European Food Safety Authority) nanopartiküllerden genellikle mühendislik ürünü nanomateriyal (ENM, Engineered Nanomaterials) olarak bahsetmektedir. EFSA, bir ENM'nin spesifik olmayan tanımını (en az bir boyutta 1-100 nm boyutunda bir malzeme olarak) benimsemektedir. Bir üründe böyle bir malzeme mevcutsa, bunun tehlikeli olmadığını kanıtlamak için ayrıntılı bir risk değerlendirmesi yapılması gerekmektedir [36].

Genel olarak enkapsüle edilmiş materyaller boyutlarına göre nanokapsül ($< 1\mu\text{m}$), mikrokapsül (1-1000 μm) ve makrokapsül ($> 1000\mu\text{m}$) olarak sınıflandırılmaktadır.

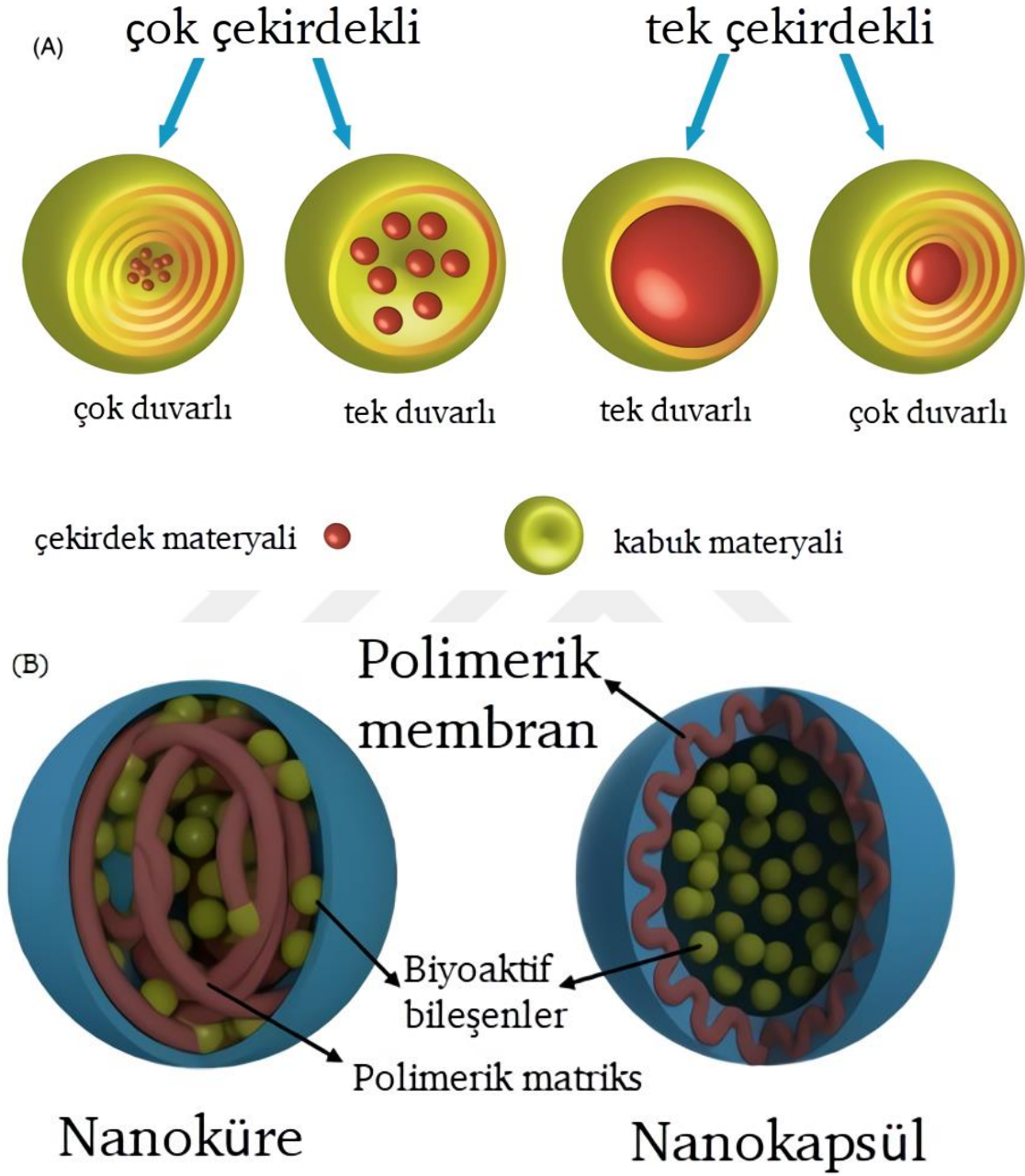
Nanoenkapsüller doğal olarak da bulunabilir. Bunların sütte kazein miselleri (<100 nm), mitokondri (500-10,000 nm) ve virüsler (10-300 nm) gibi çok sayıda örneği vardır [1].

Gıda endüstrisi; verimli, yüksek kaliteli ve güvenli gıdaların üretilmesi ile çevresel olarak kabul edilebilir ve sürdürülebilir sistemlerin geliştirmesinde ve uygulanmasında büyük zorluklarla karşı karşıyadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek amacıyla süreçler, ürünler ve araçlar için birçok yenilik ortaya konulmaktadır [37]. Gıda nanoteknolojisinin gıda endüstrisindeki uygulamaları büyük bir hızla gelişmekte olup, nanoteknoloji bu sorunların çözümünde birçok yenilik ve fırsat sunmaktadır. Çeşitli nano ölçekli malzemelerin kullanımı, gıdaların raf ömrü boyunca doku, tat, diğer duyuşsal özellikler, renklendirme gücü, işlenebilirlik ve stabilite gibi makro ölçekli özellikleri üzerinde değişimlere yol açarak onların özelliklerini geliştirebilmekte ya da değiştirebilmektedir. Ayrıca nanoteknoloji, biyoaktif bileşiklerin suda çözünürlüğünü, termal stabilitesini ve biyoerişilebilirliğini de geliştirebilme potansiyeline sahiptir [38–43]. Bu açıdan nanoteknoloji, “çiftlikten çatala” gıda döngüsünün tüm aşamalarında kullanılabilecek uygulama alanlarına sahiptir.

2.2 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, katı, sıvı veya gaz halindeki maddelerin belirli koşullarda yüklerini kontrollü bir şekilde serbest bırakabilen matrisler ile çevrelenmesi olarak tanımlanmaktadır [44,45]. Enkapsülasyon işlemi çok farklı amaçlarla uygulanmaktadır. Enkapsülasyon, eczacılıktan tarıma, pestisitlerden enzimlere kadar geniş bir yelpazede bilimsel ve endüstriyel olarak ilgi duyulan bir konudur. Enkapsülasyon ve kontrollü salım teknolojisi ilaç dağıtım sistemleri alanında en gelişmiş teknolojilerden biri olmasının yanında, gıda endüstrisinde de devrim yaratmıştır [46]. Genel olarak enkapsülasyonun amacı temel olarak kararsız ve hassas biyoaktif maddeleri istenmeyen çevresel koşullardan korumaktır. Enkapsülasyon işleminde kaplama materyali “kabuk, duvar materyali, membran, dış faz, taşıyıcı ve kapsül ajanı”, kaplanacak materyal ise “iç faz, çekirdek materyal, enkapsülant, aktif materyal ve dolgu” gibi isimlerle adlandırılmaktadır [47,48].

Mikro/nanokapsüller, tek çekirdekli veya çok çekirdekli olmak üzere iki temel kategoride sınıflandırılabilir ve ayrıca her biri tek duvarlı veya çok duvarlı olarak da gösterilebilir (Şekil 2.1) [1].



Şekil 2.1 A) Mikrokapsül morfolojisinin (B) Nanoküre ve nanokapsülün şematik gösterimi [1]

2.3 Nanoenkapsülasyon

Nanoenkapsülasyon, gıda endüstrisinde nanoteknolojinin yeni ve pratik bir dalıdır. Nanoenkapsülasyon terimi; filmler, katmanlar veya nanodispersiyonlar kullanarak nanometre ölçeğinde enkapsülasyonu açıklamaktadır. Nihai kapsül, gıda bileşenleri ve/veya nutrasötikler için nano ölçekli bir kalkan görevi görmektedir. Genellikle aktif bileşen, molekül veya nanoölçeğin içindedir. Nanoenkapsülasyonun en önemli avantajları; gelişmiş fiziksel ve kimyasal özellikler, yüksek enkapsülasyon etkinliği ve genellikle homojen partikül dağılımıdır [49,50]. Nanoenkapsülasyon gıda sektöründe hızla gelişmektedir. Gıda ve beslenme alanında nanoenkapsülasyon teknolojisi kullanılarak katma değeri yüksek gıda maddelerinin üretilmesi mümkündür [51].

Bazı biyoaktif bileşiklerin hidrofobik doğası göz önüne alındığında, bu malzemelerin sıvı gıda ve içecek sistemlerine ilavesi, katı bazlı bir sistem ile karşılaştırıldığında daha zordur [51,52]. Örneğin, püskürtülerek kurutulmuş tozlar sıvı bir gıda ile doğrudan karıştırılamaz. Çünkü böyle bir durumda duvar malzemesinin stabilitesi ve entegrasyonu bozulur ve içindeki bileşen yığın fazda serbest kalır. Bu nedenle, nutrasötiklerin sıvı bir matrise ilavesi için planlı ve doğru bir kapsülleme stratejisi gereklidir. Nanoenkapsülasyonun farmasötik, tıp ve kozmetik alanlarındaki uygulamaları gıda alanındaki uygulamalarından daha yaygındır. Ayrıca gıdaların karmaşık yapısına uygun food-grade (gıdada kullanılabilir) yapıların kullanılmasının gerekliliği, bu sistemin gıda sektöründe kullanılmasını daha da karmaşık hale getirmektedir [52].

Antioksidanlar, uçucu yağlar ve vitaminler gibi biyoaktif bileşenlerin nano ölçekte enkapsüle edilerek gıdalara ilavesi yeni fonksiyonel gıdaların elde edilmesinde kullanılan pratik bir yoldur [3]. Enkapsüle bileşenler, sindirim sistemindeki fiziksel streslere dayanacak ve yüklerini özel bir yerde teslim edecek şekilde formüle edilebilir. Yarı katı ve katı olmayan gıda ürünleri göz önüne alındığında, kapsül boyutunun nano ölçeğe indirgenmesi, duyu özelliklerde herhangi bir değişikliğe yol açmadan ürünün fonksiyonel özelliğini geliştirebilmektedir [53]. Ayrıca salım hızı doğrudan partikül boyutuyla ilişkilendirilmektedir.

Vücut içerisinde mikron altı boyuttaki nanopartiküller spesifik hücreler tarafından daha verimli bir şekilde emilebilmektedir [43]. Bununla birlikte partiküllerde boyut küçültme, nanopartiküllerin yüzey-hacim oranındaki artışa bağlı olarak biyolojik yapışma özelliklerinin gelişmesinin yanında sindirim sistemi boyunca daha uzun süreli kontrollü salıma, bu da biyoaktif moleküllerin biyoyararlılıklarının daha da artmasına imkan tanımaktadır [54].

Yiyecek ve içecek endüstrisi her yıl genişleyen milyarlarca dolarlık bir pazar olan nanoteknoloji uygulamasına büyük yatırım yapmıştır. Bu yaklaşım son zamanlarda daha çok yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılsa da nanoteknolojinin küresel olarak çok daha fazla uygulama alanı bulacağı varsayılmaktadır [55]. Nanogıda ürünleri ambalaj malzemelerine ve işlenmiş sağlıklı gıdalara uygulanan nanotaşıyıcı sistemlerini de kapsamaktadır [56]. Gıda ve ambalaj malzemeleri üretmek için 400'den fazla şirketin nanoteknolojiden faydalandığı bildirilmektedir [57]. Nanogıda pazarı 2003 yılında 2,6 milyar ABD doları ekonomik büyüklüğe sahip iken, 2015 yılında 20,4 milyar ABD dolarına ulaştığı bildirilmiştir. Buna göre, büyüyen bu pazarın gelecek yıllarda büyümesini sürdüreceği tahmin edilmektedir [1].

Nanokapsüllerin mikrokapsüllere göre çeşitli avantajları vardır. Geniş yüzey alanları, daha yüksek reaktivite, daha yüksek çözünürlük, gelişmiş biyoyararlılık ve hedefe yönelik salım gibi özellikler nanokapsülleri mikro/makro boyuttaki eşdeğerlerinden ayırmaktadır [37,43]. Gıdaların arzu edilen duyuşal özelliklerini değiştirmeden nanotaşıyıcılar kullanılarak biyoaktif bileşikler gıda ağına dahil edilebilmektedir [39]. Gıda formülasyonuna dahil edilecek nano madde oranı, taşıyıcının büyüklüğü ile de güçlü bir şekilde ilişkilidir [58]. Bazı durumlarda salım işlemi sadece taşıyıcı boyutu mikron seviyesinin altındaysa gerçekleşmektedir. Daha küçük boyutta olan nanopartiküller yüzeylere kolayca yapışabilmektedir. Ayrıca partiküllerin sahip oldukları yükler ve van der Waals kuvvetleri salım profili üzerine önemli ölçüde etki etmektedir. Bu faktörler, sindirim sistemi içinde sürekli bir salımı indükleyebilmekte ve kontrollü salım süresini uzatabilmektedir [6,39,49].

Genel olarak nanoteknolojinin gıda bileşenlerinin kapsüllenmesi noktasındaki başlıca avantajları şunlardır [1];

1. Mevcut yüzey alanı arttıkça, gıda bileşenlerinin biyoerişilebilirliği de önemli ölçüde artar. Bu durum düşük çözünürlükteki aroma maddeleri ve/veya düşük aroma ve koku algılama eşikleri için son derece önemlidir. Bazı biyoaktif bileşikler, yutulduktan sonra hızla emilir ve metabolize olur. Bu nedenle hedef organlara ulaşmadan faydalı etkilerini kaybederler. Nanotaşıyıcılar, gıda bileşenlerini sindirim sırasında korur ve sindirim işlemi sırasında programlı bir salım uygular. Böylece gıda bileşenlerinin hedef organa ulaşmasını sağlayarak biyoerişilebilirliklerini artırabilir.
2. Nano dağıtım sistemleri, daha yüksek yüzey alanlarından ötürü mikro ve makro ölçekli karşılıklarına göre daha reaktiftir.
3. Hedeflenmiş ve programlanmış bir salım sağlaması nedeniyle biyoaktif bileşenin hedef olmayan noktalarda gereksiz salımını engeller.
4. Suda az çözünen bileşenlerin çözünürlüğünde iyileşme sağlar. Örneğin omega-3 balık yağı, bir misel ağı ile suda çözünebilir özellik sağlanabilir.
5. Optik olarak şeffaflık (özellikle içecek uygulamasında önemlidir) sağlar. Örneğin 100 nm'den düşük boyuttaki yağ damlacıklarına sahip nanoemülsiyonlar optik olarak şeffaftır.
6. Sprey kurutma sırasında işlem süresinde daha yüksek biyoaktif tutulma(uçucu organik karbon (Volatile Organic Carbon, VOC) azalma) sağlar.
7. Daha homojen bir yapı oluşmasını sağlar.
8. Reaktifliği yüksek enkapsüle edilmiş ingredientler elde edilir.
9. Biyoaktif bileşenlerin diğer gıda bileşenleri ile istenmeyen reaksiyonlarının sınırlandırılması ve tüketim sırasında ve sonrasında degradasyonlarının önlenmesi sağlar.

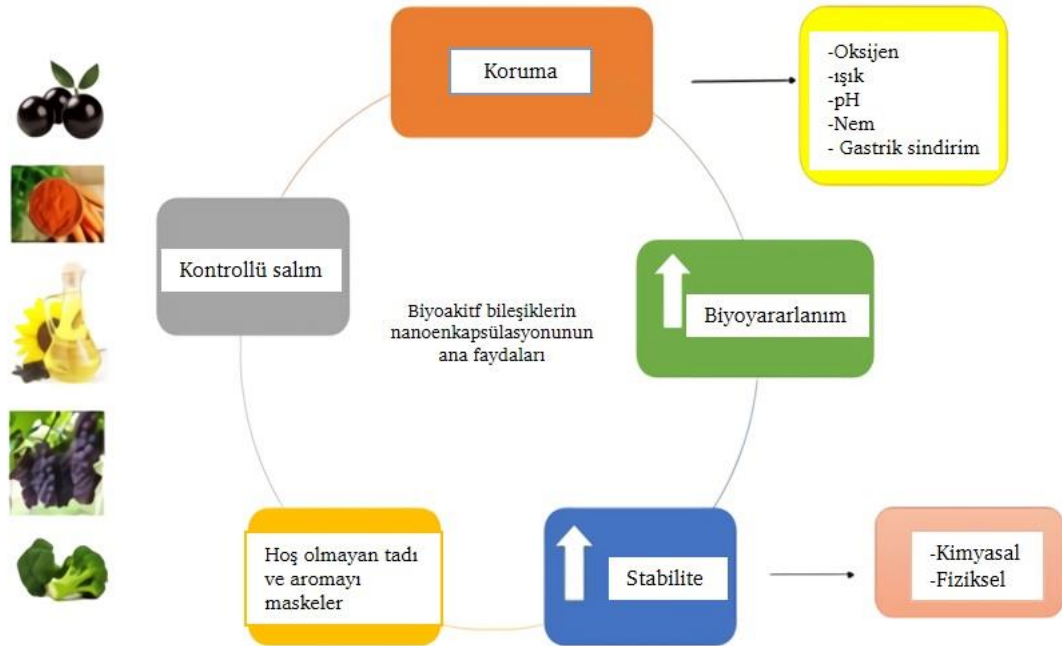
2.3.1 Nanoenkapsülasyon Tekniklerinin Sınıflandırılması

Nanoteknoloji, birçok sektörde başarılı uygulamalara sahiptir. Bu teknoloji; özellikle işleme, paketlenme, depolama, nakliye, işlevsellik ve gıda güvenliği gibi gıda bilimi ile ilgili alanlarda uygulama alanı bulmuştur [59]. Bu anlamda, endüstri ve akademik araştırmacılar, fonksiyonel bileşikler kapsülleyebilen, koruyabilen ve serbest bırakabilen yenilebilir sistemlere duyulan ihtiyaçtan yola çıkarak gıda ve beslenme ile ilgili konuları ele almak için nanoteknoloji üzerinde durmaktadır [60]. Daha sağlıklı ve doğal gıdalara yönelik mevcut tüketici talebi, sentetik maddelerin doğal bileşenlerle ikame edilmesi konusundaki ilginin artmasına neden olmuştur [61].

İnsan sağlığı için gerekli olduğu düşünülen biyoaktif bileşikler çoğunlukla hidrofobik özellikte ve zayıf çözünürlüğe sahiptir. Bu özellikte olan bileşenler arasında fenolik bileşikler, karotenoidler, uçucu yağlar ve suda çözünmeyen vitaminler bulunmaktadır. Bu bileşiklerin farmasötik ve gıda endüstrilerinde kullanımlarını sınırlayan başlıca etmenler düşük biyoyararlılık ve stabiliteleridir. Nanoenkapsülasyon; biyoaktif bileşikler uygun olmayan çevresel koşullara karşı korumakta, biyoyararlılık ve stabilitelerini arttırmaktadır. Böylece gıda ve farmasötik ürünlerindeki uygulamalarını desteklemek için kullanım potansiyeline sahip bir teknik olarak görülmektedir [19]. Ek olarak, kapsülleme uçuculuğu azaltır, kimyasal ve termal stabiliteyi artırır, oksijen, ışık, pH, nem ve mide sindirimine karşı korur, hoş olmayan tat ve aromayı maskeler; kontrollü salımı (nem ve pH ile tetiklenen) teşvik eder, lipofilik bileşiklerin sulu ortamdaki çözünürlüğünü artırır ve besin maddelerinin uzun süreli emilimini sağlar. Ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan potansiyeli olan ambalaj malzemelerinin geliştirilmesinde kullanılabilir. Kullanım kolaylığı, gelişmiş kararlılık, çoklu aktif bileşenlerin ardışık olarak verilmesi, lezzet karakterinin geliştirilmesi ve uzun süreli organoleptik algı dahil pek çok fayda sağlamaktadır.

Bu avantajların tümü partiküllerin boyutlarının azaltılması ve böylece birim hacim başına düşen yüzey alanının artırılması ile mümkün olmaktadır [62].

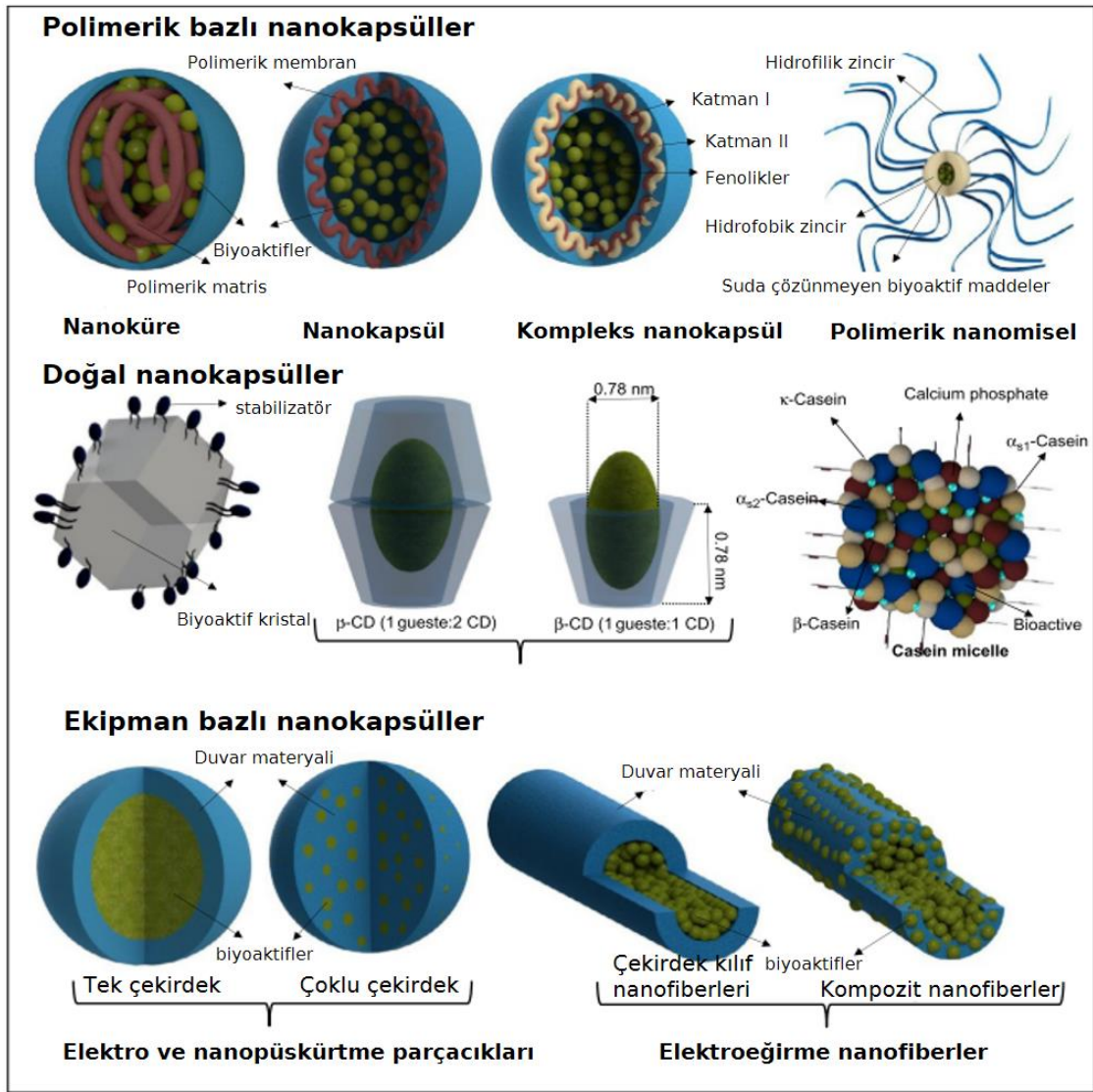
Şekil 2.2’de biyoaktif bileşiklerin nanoenkapsülasyonunun faydaları gösterilmiştir [60].



Şekil 2.2 Biyoaktif bileşiklerin nanoenkapsülasyonunun faydaları[55]

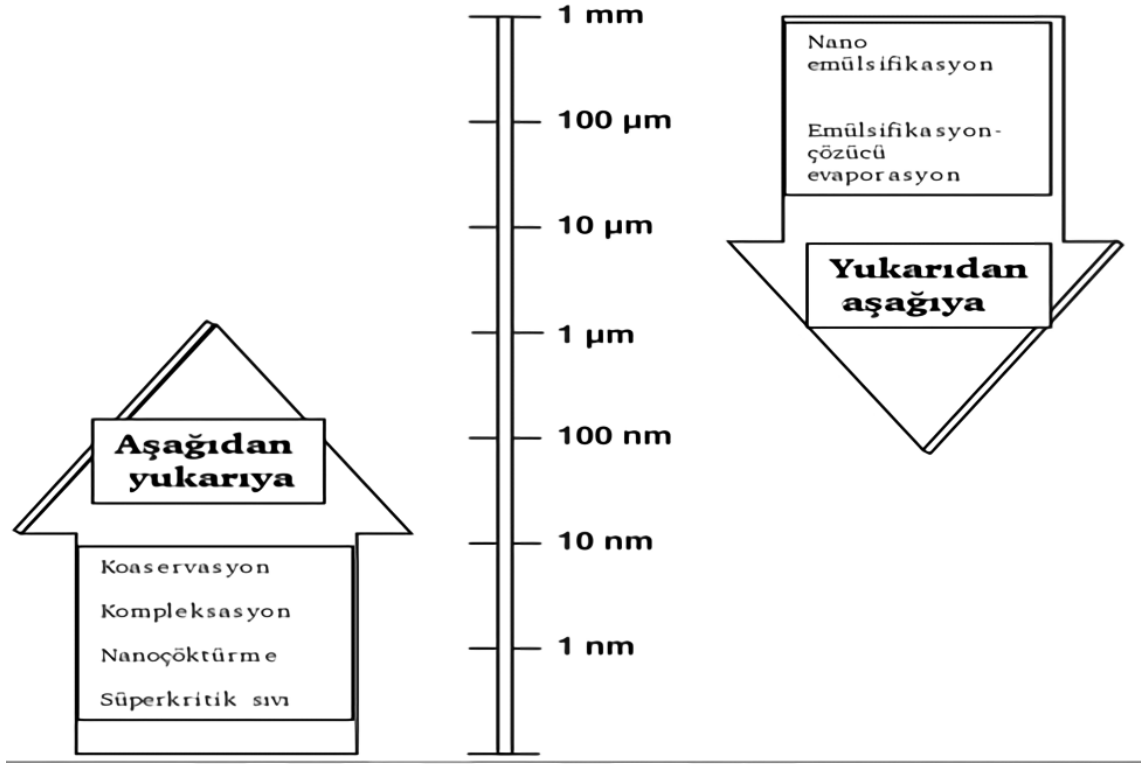
Nanoenkapsülasyon sistemleri, kapsüllenen materyalin biyoyararlılığını geliştirmesinin yanı sıra kullanım kolaylığı, gelişmiş kararlılık, oksidasyona karşı koruma, uçucu bileşenlerin tutulması, tat maskeleyme, nemle tetiklenen kontrollü salım, pH ile tetiklenen kontrollü salım, çoklu aktif bileşenlerin ardışık olarak verilmesi, değişim dahil çok sayıda fayda sunmaktadır, lezzete ve uzun süreli organoleptik algıya katkı sağlamaktadır [37,43].

Gıdalarda bulunan biyoaktif bileşenler ve nutrasötiklerin enkapsülasyonu için birçok taşıyıcı ajan araştırılmıştır. Bunlardan bazıları nanoemülsiyonlar, nanoyapılı lipit taşıyıcılar, nano-süspansiyonlar, katı lipit nanopartikülleri, nanolipozomlar, biyopolimerik nanopartiküller, proteinlerden yapılmış miseller, polisakkaritler, bunların kompleksleri veya konjugatlarıdır. Bu teknikler ile nano ölçekli taşıyıcılar (10-1000 nm) oluşturulur. Nanopartikül taşıyıcı sistemlerinden bazıları Şekil 2.3’de verilmiştir [3].



Şekil 2.3 Polimerik, doğal ve ekipman bazlı yöntemlerle nanoenkapsüle edilmiş biyoaktif bileşiklerin şematik gösterimi[3]

Klasik bir bakış açısıyla, nanoenkapsülasyon teknolojileri iki ana sınıfa ayrılabilir: Bunlar “yukarıdan aşağıya” ve “aşağıdan yukarıya”dır. Şekil 2.4’te yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımlarının şematik gösterimi verilmiştir [33].



Şekil 2.4 Nanokapsülasyonda yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımın şematik gösterimi [33]

“Yukarıdan aşağıya” yöntemiyle kapsülleme işlemi sırasında, mekanik kuvvetler kullanılması gibi çeşitli işlemlerle partikül boyutu düşürülmektedir. Nanoemülsifikasyon ve emülsifikasyon-çözücü evaporasyon teknikleri yukarıdan aşağıya tekniğe örnek olarak verilebilmektedir. "Aşağıdan yukarıya" yaklaşımında ise, partikül boyutu çeşitli yöntemlerle arttırılmaktadır; kendi kendine birleşme gibi uygulamalarla boyutta büyüme meydana getirilmektedir. Koaservasyon, kompleksasyon ve nanoçöktürme gibi teknikler bu yaklaşıma örnek olarak verilebilir. Ayrıca bazı durumlarda, her iki yaklaşımın bir kombinasyonu da kullanılabilmektedir [33].

Bu sınıflandırma günümüzde yetersiz görülmüş ve Jafari (2017) tarafından beş farklı gruptan oluşan yeni bir sınıflandırma önerilmiştir [1]. Şekil 2.5’te gıda biyoaktif bileşenleri ve nutrasötikler için geçerli olan farklı bir nanoenkapsülasyon sınıflandırması verilmiştir [63].



Şekil 2.5 Gıda biyoaktif bileşenleri ve nutrasötikler için geçerli olan farklı nanoenkapsülasyon tekniklerinin sistematik bir sınıflandırması [58]

Bu tekniklerle fizikokimyasal özellikleri, partikül boyutu, salım özellikleri, yatırım ve işletme maliyeti birbirinden çok farklı özelliklerde olan nanokapsüller üretilir. Bu teknikler içerisinde lipid bazlı nanoenkapsülasyon teknikleri olan nanoemülsiyonlar, nanolipozomlar, katı lipid nanopartikülleri ve nanoyapılandırılmış lipid taşıyıcılar, literatürde gıda bileşenlerinin nanoenkapsülasyonunda en yaygın kullanılan tekniklerdir. Bu teknikler yalnızca laboratuvar ya da pilot ölçekte değil aynı zamanda endüstriyel boyutta da uygulanabilir olmaları nedeniyle öne çıkmaktadır. Kazeinler, siklodekstrinler ve amiloz gibi doğal nanotaşıyıcılar da umut vadeden kapsül ajanları olarak dikkati çekmektedir. Özel ekipman gerektiren nanoenkapsülasyon teknolojileri olan elektroegirme ve elektropüskürtme teknolojilerinde ise doğal biyopolimerlerin kullanımı ile ilgili halen bazı sorunlar bulunmaktadır. Bu teknolojilerin endüstriyel boyutta kullanımı için bu sorunların aşılması gerekmektedir. Nanopüskürtmeli kurutma ile ilgili laboratuvar ölçeğindeki çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak endüstriyel uygulamalar için ölçek büyütme çalışmaları gerekmektedir.

Biyopolimerik bazlı nanopartikül üretim tekniklerinden biri olan kompleksasyon ile istenen özelliklerde nanotaşıyıcı sistemlerin tasarımı mümkün olmaktadır [47].

Tablo 2.1’de gıda bileşenleri ve nutrasötiklere uygulanabilen nanoenkapsülasyon teknolojilerinin sınıflandırılması ve genel özellikleri verilmiştir [1,63].



Tablo 2.1 Gıda bileşenleri ve nutrasötiklere uygulanan nanoenkapsülasyon tekniklerinin sınıflandırılması[1,63]

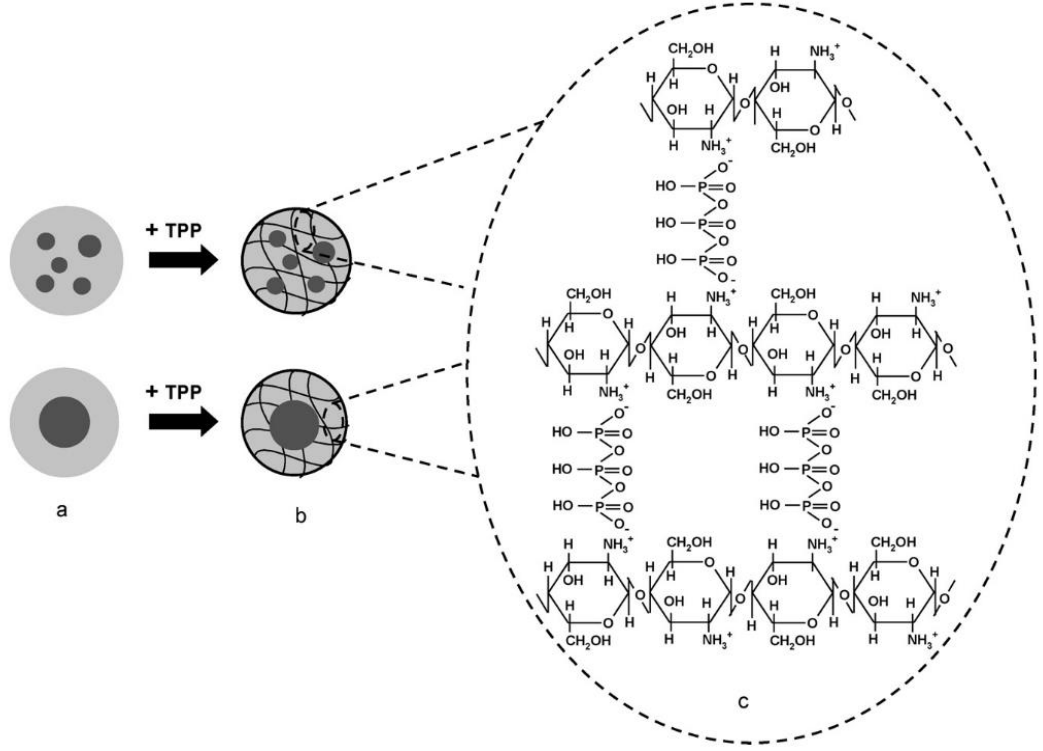
Teknoloji	Nano taşıyıcılar	Genel özellikleri
Lipid formülasyon bazlı nano enkapsülasyon	Nano emülsiyonlar	-Basit emülsiyonlar (yağ/su veya su/yağ) veya çoklu emülsiyonlar. Dağılmış faz damlacık boyutları tipik olarak 500 nm'den azdır. - Damlacıklar kinetik olarak stabildir ve elde etmek için yüksek enerji girdisine ya da mikro emülsiyonlar için düşük enerjiye ihtiyaç duyar (<100 nm). -Optik olarak berrak süt gibi bir görünüm.
	Nano lipozomlar	-Lesitin gibi bir çift katlı lipid ile kaplanmış, su içeren bir çekirdeğe sahip küresel partiküllerdir. -Hem hidrofilik hem de lipofilik gıda biyoaktif maddeleri için iyi taşıyıcılardır.
	Nano lipid taşıyıcılar	-Katı lipidlerin kendi halinde ya da katı lipidlerin ikili karışımından ve hibrit taşıyıcı olarak boyutsal farklı sıvı lipitten oluşur. -Ortalama boyut 10–500 nm
Doğal nanotaşıyıcı bazlı nano enkapsülasyon	Kazeinler	- Kendi kendine birleşen kazein nanoyapıları - Ortalama boyut 50–300 nm -Hidrofobik biyoaktif maddeler için kullanışlı.
	Siklo dekstrinler	-Kendi kendine birleşerek topaklaşırlar, lipofilik biyoaktif maddeler ile ilave komplekslerinin oluşumu -Suda az çözünen bileşiklerin çözünürlüğü artırılır.
	Nano kristaller	-En az bir boyutu ≤ 100 nm olan kristal nanopartiküller -Doygunluk çözünürlüğünün artırılması, çözünme hızı ve yüzey/hücre zarlarına yapışkanlık gibi özel özellikler sağlayabilir.
Özel ekipman bazlı nano enkapsülasyon	Elektroeğirme	-Nanoaralıkta matrisler üretmek için sulu bir çözelti ile oda sıcaklığında ve koagülasyon olmadan üretim imkanı sağlar. -1 μ m'den daha düşük nanoliflerin üretimi
	Elektro püskürtme	- Elektroeğirme tekniğine çok benzer -Polimer çözeltisinden kürelerin üretimi, yüksek bir elektrik alanı uygulayarak, farklı nutrasötikler kapsüllenebilir.
	Nanopüskürtmeli kurutma	-Klasik sprey kurutuculardan çok daha küçük bir boyut aralığında küçük damlacıklar (buharlaştırmadan önce) oluşturma -Çok sınırlı dağılımla ve yüksek formülasyon verimleri ile mikrondan daha düşük boyut aralığında toz partikülleri üretebilir.

Tablo 2.1 Gıda bileşenleri ve nutrasötiklere uygulanan nanoenkapsülasyon tekniklerinin sınıflandırılması (devamı)

Teknoloji tipi	Nano taşıyıcılar	Genel özellikleri
Biyopolimer nanopartikül bazlı nanoenkapsülasyon	Tek biyopolimer nanopartiküller	-Farklı biyopolimerlerden bir araya getirilmiş koloidal yapılar. -Desolvasyon tekniği ile protein NP' lerinin üretimi. -Nanopresipitasyon yöntemi ile karbonhidrat (esas olarak nişasta) bazlı NP'lerin hazırlanması.
	Biyopolimerlerin kompleksi	Nanoyapılar, çeşitli biyopolimer -biyopolimer birleştirici etkileşimleri yoluyla proteinler ve polisakkaritler gibi biyo polimerlerin bir kombinasyonu ile yapılır. Esas olarak protein anyonik polisakkarit ve protein katyonik-polisakkarit komplekslerinden oluşur.
Diğer nanoenkapsülasyon teknikleri	Protein nanotüpler	- Esas olarak peynir altı suyu proteinlerinin bir kısmı olan α -laktalbümininden üretilir. -Protein konsantrasyonu kritiktir ve nanotüpler enzimatik hidroliz ve kalsiyum iyonu köprüleme yoluyla oluşturulur.
	Karbonhidrat nanojel	-Bir hidrojel (hidrofilik biyoaktif maddeler için) veya organojelden (hidrofobik bileşikler için) oluşan NP'ler. -Çoğunlukla kimyasal veya fiziksel olarak aljinat gibi çapraz bağlı sentetik polimerlerden veya biyopolimerlerden üretilir. -Nanojellerdeki gözenekler küçük moleküller veya makromoleküller ile doldurulabilir. -Şişme, bozunma ve kimyasal işlevsellik gibi özellikleri kontrol edilebilir.
	Amiloz nanoyapılar	-Ucuz, biyoyumlu, biyolojik olarak çözünebilen ve toksik olmayan nano yapılar. -Yüksek amilozlu nişastalardan farklı yöntemlerle üretilir.

2.4 İyonik Jelasyon

Çoğu durumda sulu polimer çözeltisi olarak bulunan kaplama malzemesi ve çekirdek materyal, bir dağıtıcı fazda (örneğin, bir elektrolit çözeltisi) küresel jel şekilde nanopartiküllerin oluşumu ile sonuçlanan damlalara dönüştürülür. İyonik etkileşim nanokapsül oluşumunun temelini oluşturur. Nanokapsül oluşumunu sağlayan teknikler arasında yer alan iyonik jelasyon; organik çözücüler, farklı sıcaklık ve pH koşullarının kullanılabilmesi, proses koşullarının kontrol edilebilir olması, kararlı nanoboyutta partiküllerin oluşumu gibi üstün özelliklere sahip olması nedeniyle dikkat çekmiştir [64,65]. Bu yöntem, KS gibi pozitif yüklü polimerler ile yüksek sıcaklık ve toksik çapraz bağlayıcılar kullanmadan moleküller arası çapraz bağların oluşumunu sağlayan TPP gibi polianyonlar arasındaki etkileşime dayanmaktadır [13,66,67]. Yani iyonik jelasyon tekniği, KS'nin pozitif yüklü primer amino grupları ile TPP gibi negatif yüklü polianyon grupları arasındaki iyonik etkileşimlerle gerçekleşmektedir. KS moleküllerinin yüksek deasetilasyon ve protonlama derecesi nedeniyle yüksek pozitif yük yoğunluğu vardır ve bu durum çok sayıda potansiyel çapraz bağlama alanı oluşmasını sağlamaktadır [65]. TPP, toksik olmaması ve çok değerlikli iyonik özellikleri nedeniyle en yaygın kullanılan çapraz bağlamayıcı ajanlardan biridir [65]. İyonik jelasyon ile oluşturulan KNP'lerin hassas biyoaktif bileşiklerin enkapsülasyonu için kullanışlı olduğunu bildiren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda karvakrol [13], ellagik asit [68], öjenol [66] ve klorojenik asit [69] gibi çeşitli biyoaktif maddelerin başarıyla nano ölçekte enkapsüle edildiği bildirilmiştir. Şekil 2.6'da KS içerisinde hapsedilen biyoaktif bileşen damlacıkları, biyoaktif bileşen yüklü KNP'leri ve TPP ile iyonik olarak çapraz bağlanan KS'nin kimyasal yapısı verilmiştir [13].



Şekil 2.6 (a) Kitosan içerisinde yer alan biyoaktif bileşen damlacıkları, (b) Biyoaktif bileşik yüklü kitosan partikülleri ve (c) TPP ile iyonik olarak çapraz bağlanan kitosanın kimyasal yapısı [13]

Calvo ve ark. (1997), ilk kez iyonik jelasyon yöntemini kullanarak KNP'leri sentezlemişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada, düşük konsantrasyonlarda çalışılarak ortalama 260 nm partikül boyutu elde edilmiş, KNP'lerde berrak çözelti, bulanık süspansiyon ve agregasyon olmak üzere üç farklı sistemin oluştuğu bulunmuş ve bu farklı sistemlerin oluşumunun KS ve TPP derişimine bağlı olduğu bildirilmiştir[27].

2.4.1 Duvar Materyali Olarak Kitosan

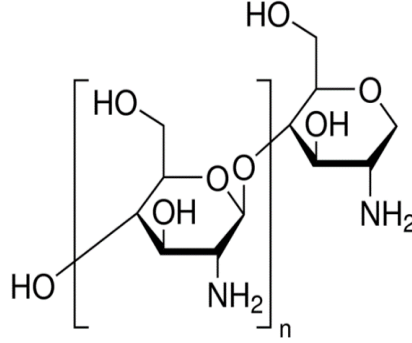
Biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesinde çeşitli duvar malzemeleri kullanılmaktadır. Bu duvar malzemelerinden bazıları Tablo 2.2’ de gösterilmiştir [1].

Tablo 2.2 Gıda katkı maddelerinin kapsüllenmesinde kullanılan bazı biyopolimer örnekleri (duvar malzemeleri)

Polisakkaritler	Yağlar ve mumlar	Proteinler	Yapay bileşikler
Arap sakızı	Hidrojenlenmiş bitkisel yağlar	Jelatin	Paclitaxel
Modifiye nişastalar	Balmumu	Peynir altı suyu proteinleri	Polietilen glikol
Maltodekstrinler	Lesitin	Sodyum kazeinat	Poliacrilonitrile
Aljinatlar	Orta zincirli trigliseritler (MCT)	Soya proteinleri	Polikaprolakton
Pektin	Gliseril behenat	Gluten	Polilaktik asit
Karajenan		Kazeinler	
Selüloz türevleri		Zein	
Kitosan		İpek fibroin	
Siklodekstrinler			
Nişasta partikülleri			

KS, rastgele dağılmış β -(1-4) glikozidik bağ içeren D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin zincirinden oluşan linear bir polisakkarittir. Bu doğal polimer belirli fungi gruplarının, özellikle zigomisetlerin hücre duvarında, böceklerde, araknidlerde ve kabuklularda doğal olarak bulunabilen kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilebilir [70]. KS’nin toksik olmama, biyoyumluluk, biyobozunurluk, katyonik özellik, biyolojik yapışma özellikleri ve geçirgenliği artırıcı gibi biyolojik özellikleri en önemli avantajlarıdır.

GRAS listesinde yer alan KS, sahip olduğu bu avantajlardan dolayı gıda endüstrisinde farklı amaçlarla kullanılmaktadır [13]. KS'nin fiziksel ve biyolojik özellikleri molekül ağırlığı (MW) ve deacetylation derecesine (DD) bağlıdır [71]. Şekil 2.7'de düşük molekül ağırlıklı (LMW) KS'nin molekül yapısı gösterilmiştir [72].



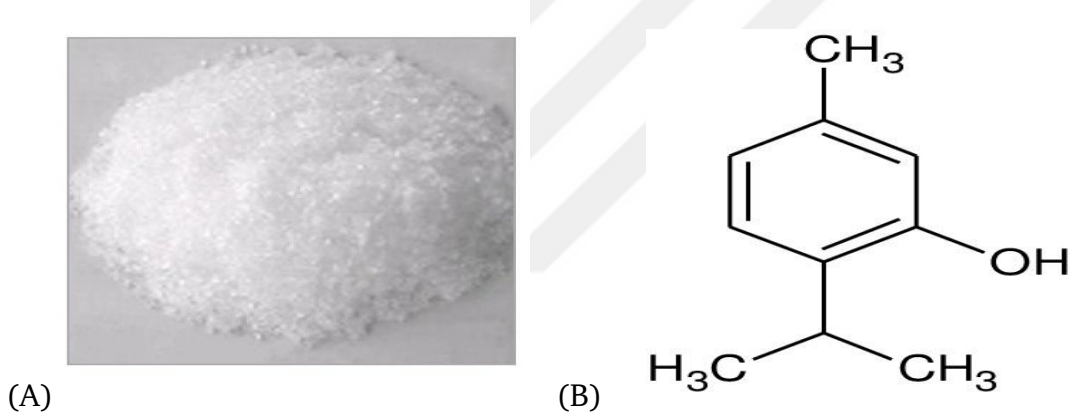
Şekil 2.7 Düşük molekül ağırlıklı kitosan (LMW) molekül yapısı [72]

KS üç fonksiyonel grup içerir. Bunlar C2 pozisyonlarında bir amino grubu ve C3 ve C6 pozisyonlarında birincil ve ikincil hidroksil gruplarıdır. KS'nin hidroksil grupları, biyofiziksel özelliklerini değiştirmeden yan grupları reaktif hidroksil gruplarına bağlayarak kimyasal bir modifikasyon yapar [73]. Çoğu durumda KS, aktif bileşikler saran bir duvar/kabuk malzemesi olarak kullanılır. Çünkü bu katyonik polisakkarit, çoklu negatif yükler taşıyan diğer maddelerle çapraz bağlanabilir [66]. KS'nin iyi antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir [74]. Ancak KS bazlı filmler, zayıf mekanik ve su buharı bariyer özelliğine sahiptir [75].

2.4.2 Çekirdek Materyali Olarak Timol

Timol (2-izopropil-5-metilfenol), aromatik bitki olan kekik türlerinin başlıca antimikrobiyal ajanıdır. Bakteri proteinlerini bağlayabilen, hücre zarının parçalanmasına ve geçirgenliğine yol açabilen fenolik ve hidrofobik bir bileşik olması nedeniyle güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahiptir. Bu özelliğinden dolayı gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Timolün gıdaların raf ömrünü uzatmak için aktif bir pakete doğal antifungal ajan olarak dahil edilebilmesi bu kullanıma örnektir [7].

Ayrıca fenolik bileşik olan timol, uçucu yağlarda bulunan çok verimli bir antioksidandır ve FDA tarafından GRAS olarak sınıflandırılır [12]. Antioksidan özelliği, toksik olmaması ve anti-mutajenik özelliği nedeniyle timol gıda, tıbbi ve kozmetik endüstrisinde koku/tat verici ajan veya raf ömrünü uzatan doğal koruyucu olarak kullanılmaktadır [9,24]. Kimyasal yapısı şekil 2.7 (B)'de gösterilen bu beyaz kristal bileşik (Şekil 2.7 (A))[24], radikal süpürücü özelliği nedeniyle reaktif oksidaz sistemi (ROS) tarafından başlatılan lipid peroksidasyonunu inhibe edebilir [76]. Bununla birlikte, yüksek derecede uçucu nitelikte olması ve sudaki düşük çözünürlüğü gıdalarda kullanımının önündeki en büyük dezavantajdır. Bu yüzden; bu zorlukların üstesinden gelmek ve verimliliklerini arttırmak için uygun yaklaşımlarla bu bileşiğin kapsüllenmesi arzu edilmektedir [77].



Şekil 2.8 (A) Timolün kristal formu ve (B) Timolün kimyasal yapısı[24]

2.5 Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım en az sayıda deneyle maksimum bilgi elde etmek için deneylerin nasıl planlanacağı ve yapılacağının metodolojisidir. Öncelikle deneysel tasarım oluştururken etki etmesi muhtemel tüm parametrelerin/faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Ön denemeler ile etkisi olmayan parametreler çalışma planından çıkarılmaktadır. Etkili olması muhtemel faktörlerin çalışma aralığı, yine ön denemeler ile belirlenmektedir. Daha sonra, uygulanacak deneysel tasarım modeli seçimine geçilmektedir.

En uygun deneysel tasarım modeli (fonksiyonel, box behnken, merkezi kompozit tasarım vs.) belirlendikten sonra deneme tasarımı oluşturulmakta ve çalışma sürdürülmektedir.

Deneysel tasarım yöntemleri optimizasyon, araştırma, geliştirme ve üretim gibi farklı konuları sistematik olarak incelemek için kullanılmaktadır [78,79]. Deneysel tasarım birçok alanda uygulanmaktadır. Bunlardan biri değişkenler arasındaki ilişkileri araştırmak ve çok sayıda değişkenden önemli olanları belirlemektir. Bir çalışmada sonuç üzerinde etkin olan çok sayıda değişken varsa, bu tür çalışmaların tasarlanmasında deneysel tasarım yöntemlerinin kullanılması çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bu prosesler genellikle birçok faktör tarafından etkilenen kompleks sistemlerdir. Deneysel tasarım, bu sistemlerin fonksiyonlarla ifade edilmesini ve çok sayıda etkin olan değişken arasındaki önemli etkileşimlerin ortaya konulmasını sağlamaktadır. Bir veya birden fazla yanıt üzerinde birak bağımsız değişkenin potansiyel etkisinin olduğu deneysel durumlarda uygulanmaktadır ve sağladığı avantajlarla optimum koşullarda belirlenen tahmini yanıt değerlerinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan deneysel tasarımın en büyük üstünlüğü, birak faktörün eş zamanlı olarak değiştirilebilmesi ve her bir faktörün bağımsızca değerlendirilmeye alınabilmesidir [80].

2.5.1 Faktöriyel Tasarım

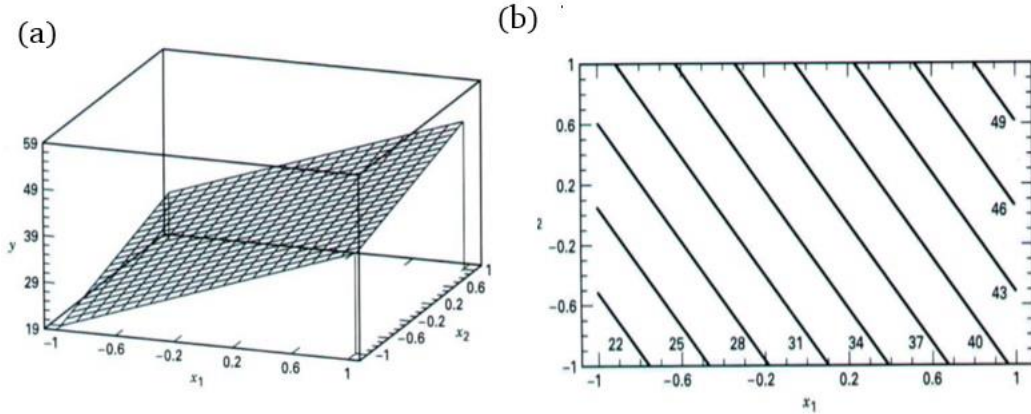
Gıda maddelerinin fizikokimyasal karakteristik özelliklerinin karışık olması ve bu özelliklerin modellenmesinde kullanılan etkili olabilecek parametrelerin fazlalığı, bu alandaki çalışmaları diğer alanlara göre zorlaştırmaktadır [81]. İki veya daha fazla faktörün etkisinin incelendiği bu gibi alanlarda faktöriyel tasarımlar en verimli yöntemlerden biridir. Faktöriyel tasarım sayesinde etki eden tüm parametrelerin olası kombinasyonlarının etkisi incelenerek optimize edilebilmektedir [82].

Bu açıdan faktöriyel deney tasarımları, deneyleri optimize etmek ve hangi faktörlerin deneyin sonucunu etkilediğini ve bu faktörlerin hangi seviyelerinin daha iyi yanıtı yol açtığını anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır [83].

2.5.2 Kısmi Faktöriyel Deneysel Deneme Tasarımı

Kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı, deneysel bir sistemde seçilen herhangi bir bağımlı parametre üzerinde sistemdeki diğer bağımsız parametrelerin her birinin tek başına ve diğer parametrelerle birlikte cevaba olan etkilerini veren bir bağımsız değişken elimine etme yöntemidir. Bu yöntem, deneysel tasarımı etkileyen en önemli parametrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem sayesinde parametreler belirlenmekte ve daha az deney ile daha hızlı ve daha iyi sonuçlar elde edilmektedir [84]. Eldeki kaynaklar kısıtlı olduğu ve yüksek dereceli etkileşimlerin önemli olmadığı varsayıldığı için kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı kullanılmaktadır.

Şekil 2.9’da bu modelin grafiksel gösterimi verilmiştir. Şekil 2.9 (a)’da x_1 ve x_2 ‘nin değişik kombinasyonlarının y değerlerinde meydana getirdiği düzlemin plotu gösterilmektedir. Bu üç boyutlu grafiğe “tepki yüzey plotu (response surface plot)” denmektedir. Şekil 2.9 (b) x_1 ve x_2 düzleminde sabit y tepkisinin “dış hatlar (contour)” doğrularını göstermektedir. Tepki yüzeyi bir düzlem olduğundan, dış hatlar plotu paralel düz doğruları içermektedir [85].



Şekil 2.9 Kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı modelinde örnek grafiksel gösterim[85],

(a) Tepki yüzeyi (b) Dış hatlar plotu

3.1 Materyal

Bu çalışmada kaplama materyali olarak düşük molekül ağırlıklı kitosan (LMW-%85 deasetile edilmiş- Sigma Aldrich, Almanya), çapraz bağlayıcı ajan olarak ise sodyum tripolifosfat (STPP, teknik kalite) kullanılmıştır. Kitosanı çözündürmek için kullanılan asetik asit (>99,7 saflık) ve biyoaktif bileşen olan timol Sigma-Aldrich'ten (Almanya) temin edilirken, emülsifiyer olarak kullanılan tween 80 (HLB 15.9) Merck'ten (Almanya) satın alınmıştır. Etil alkol (C_2H_5OH , %99 saflıkta) ve 1, 1-DiPhenyl-2- PicrylHydrazyl (DPPH), diyaliz tüpü selülöz membran (düz genişlik 25 mm (0,1 inç), 60 ml kapasite) ile fosfat (pH 7,4, pHast Pack, toz) ve asetat (pH 3, pHast Pack, toz) tampon tuzları da Sigma–Aldrich'den temin edilmiştir. KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Nutrient Broth, Nutrient Agar ve Maximum Recovery Diluent Merck (Almanya)'dan, antimikrobiyal duyarlılık testi diskleri Bioanalyse (Türkiye)'den temin edilmiştir.

3.2 Metot

3.2.1 Optimizasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

TKNP eldesinde iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle nanopartikül eldesine; duvar materyalinin türü, molekül ağırlığı ve konsantrasyonu, kaplanacak materyalin türü ve konsantrasyonu, emülsifiyer olarak kullanılacak maddenin türü ve konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı ajanın türü ve konsantrasyonu, duvar materyalinin çözünmesi için kullanılan kimyasal maddenin türü ve konsantrasyonu, karıştırma hızı, çözeltiye uygulanacak sıcaklık, çözeltinin pH'sı gibi birçok parametre etki etmektedir [28,30,65,86]. TKNP'ler elde edilmeden önce KNP'ler oluşturulmuştur. KNP eldesine de birçok parametre etki etmektedir ve bununla ilgili literatürde birçok çalışma vardır [28,65,86–88].

Bu parametreler içerisinde iyonik jelasyon yöntemiyle KNP'nin oluşmasını sağlayan KS ve TPP konsantrasyonu ayrı önem arz etmektedir. Calvo ve ark. (1997), KNP'lerin oluşumunun sadece bazı spesifik KS ve TPP konsantrasyonları için mümkün olduğunu bildirmişlerdir [27]. Bu konsantrasyonlar KNP'lerin boyutu (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI (Polidispersite indeksi) üzerine etki etmektedir. KS ve TPP konsantrasyonları nanopartiküllerin yararlılıklarını sınırlayan geniş bir partikül boyutu dağılımına ve zayıf stabiliteye sahip olmalarına neden olabilmektedir [65]. Bu açıdan optimizasyon parametresi üzerine etkisi olan KS ve TPP konsantrasyonları Tablo 3.1 'de gösterilen ön denemler yapılarak belirlenmiştir. Böylece yapılan ön denemeler ile optimizasyonda kullanılacak parametreler ve oranları belirlenmiştir.

Tablo 3.1 KNP'lerin eldesinde kullanılan ön denemeler

I deneme

Kitosan (mg/mL)									
konsantrasyonu	3	6							
TPP (mg/mL)									
konsantrasyonu	3	1,5	1	0,75	0,5	0,3	0,15	0,075	

II.deneme

Kitosan (mg/mL)					
konsantrasyonu	1,5	3	4,5	6	
TPP (mg/mL)					
konsantrasyonu	0,15	0,45	0,75		

Tablo 3.2 ‘de TKNP’lerin eldesinde sabit tutulan ve etkisi incelenen parametreler ve oranları verilmiştir.

Tablo 3.2 TKNP’lerin eldesinde sabit tutulan ve etkisi incelenen parametreler ile oranları

Sabit tutulan parametreler	Oranı ve çeşidi	Etkisi incelenen parametreler	Konsantrasyon
pH	4,6	A) Kitosan konsantrasyonu (mg/mL)	3-6
Karıştırma hızı (rpm)	500	B) Timol konsantrasyonu (mg/mL)	3-6
Kitosan molekül ağırlığı (Dalton)	Düşük molekül ağırlıklı (50-190 kDa)	C) T80 konsantrasyonu (mg/mL)	3-6
Emülsifiyer türü	Tween 80 (T80)	D) Sıcaklık (° C)	25-45
Çapraz bağlayıcı ajanın türü	Sodyum tripolifosfat (TPP)	E) TPP konsantrasyonu (mg/mL)	0,15-0,75

3.2.2 DeneySEL Tasarım

Formülasyon tasarımının optimizasyonu için kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı kullanılmıştır. Bu deney tasarımına dayalı çalışmalar [28,31,84,89], tüm faktörlerin aynı anda değiştirilmesine izin verdiği için her bir değişkenin her seviyede etkilerinin değerlendirilmesini ve aralarındaki ilişkilerin gösterilmesini sağlamıştır. Yanıt(lar) (Y) her bir deney için ölçülmüştür ve daha sonra istatistiksel olarak anlamlı terimleri tanımlamak için çoklu regresyon analizi ve F istatistikleri yapılmıştır. Etkileşimin daha iyi belirlenmesi amacıyla $p > 0,05$ olan parametreler ANOVA analizinden çıkarılmıştır.

Tablo 3.3'te kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı kullanarak elde edilen 16 deneme noktası gösterilmiştir.

Tablo 3.3 Timolün nanoenkapsülasyonda kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı kullanılarak belirlenen deneme noktaları

Deneme Noktası	Sıcaklık (°C)	KS kons. (mg/mL)	Timol kons. (mg/mL)	T80 kons. (mg/mL)	TPP kons. (mg/mL)
1	25	3	3	3	0,75
2	25	3	3	6	0,15
3	25	3	6	3	0,15
4	25	3	6	6	0,75
5	25	6	3	3	0,15
6	25	6	3	6	0,75
7	25	6	6	3	0,75
8	25	6	6	6	0,15
9	45	3	3	3	0,15
10	45	3	3	6	0,75
11	45	3	6	3	0,75
12	45	3	6	6	0,15
13	45	6	3	3	0,75
14	45	6	3	6	0,15
15	45	6	6	3	0,15
16	45	6	6	6	0,75

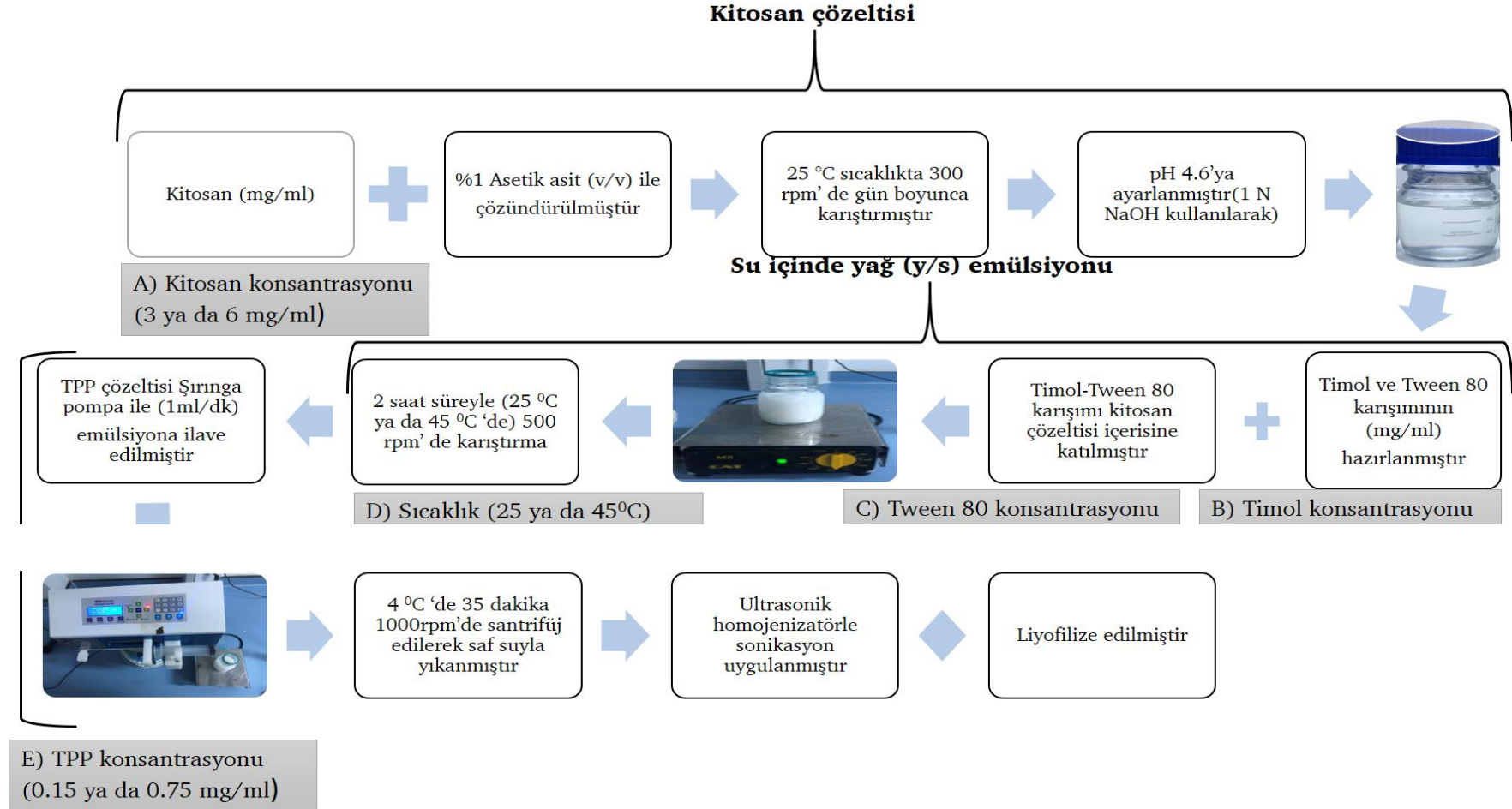
KS: Kitosan; T80: Tween 80; TPP: Tripolifosfat

3.2.3 Timolün İyonik Jelasyon Yöntemiyle Nanoenkapsülasyonu

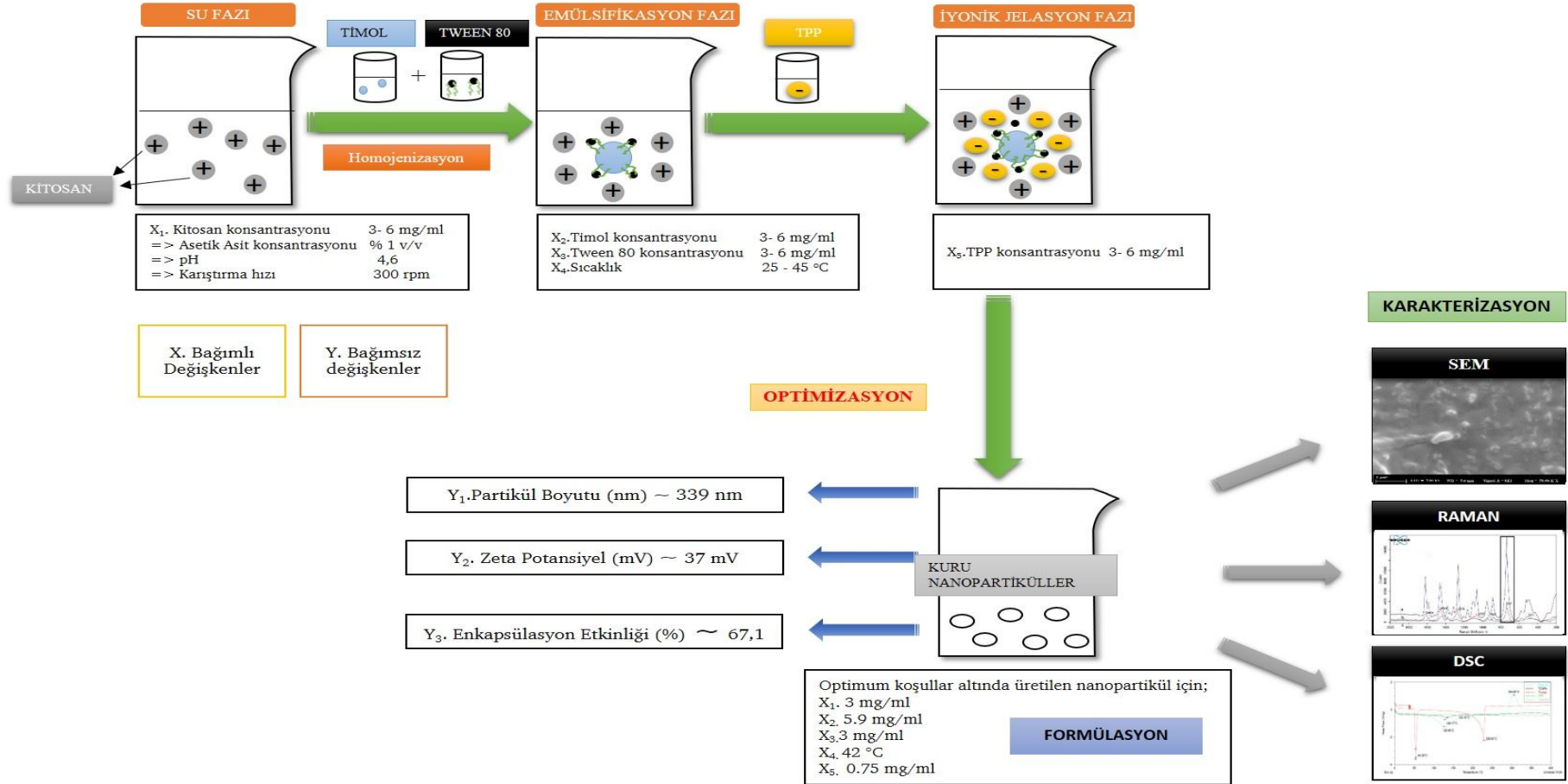
Şekil 3.1'de timolün iyonik jelasyon yöntemiyle nanoenkapsülasyon aşamaları şematik olarak gösterilmiştir. Ayrıca optimize edilen kitosan (A), timol (B), tween 80 (C) konsantrasyonları, kullanılan sıcaklık derecesi (D) ve TPP (E) konsantrasyonları da aşama aşama akış şemasında gösterilmektedir.

TKNP'lerin hazırlanmasında iki aşamalı bir yöntem kullanılmıştır. Birinci aşamada su içinde yağ (y/s) emülsiyonu oluşturulmuş, ikinci aşamada ise KS'nın TPP ile çapraz bağlanması sağlayan iyonik jelasyon yöntemiyle timol nanopartiküller içerisine hapsedilmiştir [66].

Kitosan (KS, 3 ve 6 mg/mL), % 1'lik asetik asit (v/v) içerisinde gece boyunca 25°C sıcaklıkta 300 rpm'de karıştırılarak çözündürülmüştür. Daha sonra bu çözeltinin pH değeri 4,6'ya ayarlanmış (1 N NaOH kullanılarak) ve 30 dakika aynı koşullarda karıştırmaya devam edilmiştir. Böylelikle KS çözeltisi elde edilmiştir. Önceden hazırlanan farklı konsantrasyonlarda timol (3 ve 6 mg/mL) ve tween 80 (3 ve 6 mg/mL) karışımı KS çözeltisi içerisine katılmıştır. Homojen bir karışım elde etmek için 2 saat süreyle (25°C ya da 45°C 'de) 500 rpm'de karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, KS ve timol-tween 80 karışımını içeren homojen su içinde yağ (y/s) emülsiyonu oluşturulmuştur. İkinci aşamada elde edilen emülsiyona, TPP çözeltisi (0,75 ve 0,15 mg/mL) şırınga pompa ile 1 mL/dk akış hızı ile damlalar halinde 1000 rpm'de karıştırma eşliğinde ilave edilmiştir. TPP çözeltisi tamamen ilave edildikten sonra çapraz bağlanmanın tamamlanması için 60 dakika boyunca 500 rpm'de karıştırma işlemi sürdürülmüştür. Elde edilen karışımların nihai pH değerleri 4,6-4,7 civarında bir değere ulaşmıştır. Timol içermeyen kitosan nanopartikülleri (KNP) için de aynı prosedür uygulanmıştır. İşlem sonunda oluşan nanopartiküller 4°C' de 35 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, birkaç kez saf su ile yıkanmış ve sonra tekrar saf su içinde disperse edilmiştir. Dispersiyonun homojen olması için ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus, Almanya) yardımıyla soğuk su banyosu altında 3 saniye sonikasyon uyguladıktan sonra 7 saniye bekletilerek toplamda 6 dakikalık sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Homojenize dispersiyonlar daha sonra analize kadar 4°C'de deney tüpleri içerisinde sızdırmaz şekilde kapatılarak muhafaza edilmiştir. Şekil 3.2'de emülsifikasyon-iyonik jelasyon yöntemi ile TKNP'lerin optimizasyon aşaması, elde edilen formülasyon ile bu formülasyonun doğrulanması ve karakterizasyonu ile ilgili şematik gösterim verilmiştir.



Şekil 3.1 Timolün iyonik jelasyon yöntemiyle nanoenkapsülasyonun şematik gösterimi



Şekil 3.2 Emülsifikasyon-iyonik jelasyon yöntemi ile TKNP'lerin formülasyonu, optimizasyonunu ve karakterizasyonunun şematik gösterimi

3.2.4 Partikül Büyüklüğü ve Zetapotansiyel Ölçümleri

Dinamik ışık saçılımı (DLS) nanopartiküllerin boyutunu analiz etmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemin temel prensibi, partiküllerin hareketini gözlemlemek ve Brownian hareketlerini ölçmektir. Partiküllerin hızı partikülün büyüklüğü ile ters orantılıdır ve buna translasyonel difüzyon katsayısı denilmektedir [90]. DLS, esas olarak partiküllerin yaptığı Brownian hareketi nedeniyle numuneden geçen ışık yolunda meydana gelen dalgalanmayı hesaplamaktadır [91]. Brownian hareketi süspansiyondaki partiküller, emülsiyonlar ve moleküller tarafından oluşturulur. Brownian hareketi termal enerjilerinden dolayı kendiliğinden hareket eden çözücü moleküllerinin bombardımanı ile gerçekleşen bir harekettir. Eğer partikül veya moleküller lazerle etkileştirilirse, saçılan ışığın şiddeti partiküllerin büyüklüklerine bağlı bir hızda dalgalanır. Çünkü küçük partiküller çözücü molekülleri tarafından itilirler ve daha hızlı bir şekilde hareket ederler. DLS tekniğiyle hidrodinamik çap ölçülür ve parçacığın bir sıvı içerisinde nasıl difüzlendiği ile ilgili bilgi verir. Bu teknikle belirlenen çap, ölçülen partikülle aynı difüzyon katsayısına sahip kürenin çapına eşittir. Difüzyon katsayısı sadece partikül çekirdeğinin büyüklüğüne değil, parçacığın yüzey yapısı, ortamdaki iyonların tipi ve derişimine de bağlıdır. Bu yüzden partikül boyutu elektron mikroskobu (SEM) ile ölçülenden daha büyük değerlerde olabilir [92].

Nanopartiküllerin büyüklüğü Stoke-Einstein eşitliği kullanılarak partiküllerin difüzyonundan hesaplanır. Stoke-Einstein eşitliği (3.1) aşağıda gösterildiği gibidir:

$$dh = \frac{kT}{3\pi \eta D} \quad (3.1)$$

k : Boltzman sabiti,

T : mutlak sıcaklık,

η : ortamın viskozitesi,

D : difüzyon katsayısı,

dh : partiküllerin hidrodinamik çapıdır.

D, düşük derişim değerlerinde

$$D = D_0(1 + \alpha\phi) \quad (3.2)$$

şeklinde yazılır.

D_0 : partiküller arası etkileşimin sıfır olduğu sonsuz seyreltmedeki gerçek difüzyon sabiti,

α : viral difüzyon sabiti,

ϕ : partiküllerin ortamdaki hacim kesridir.

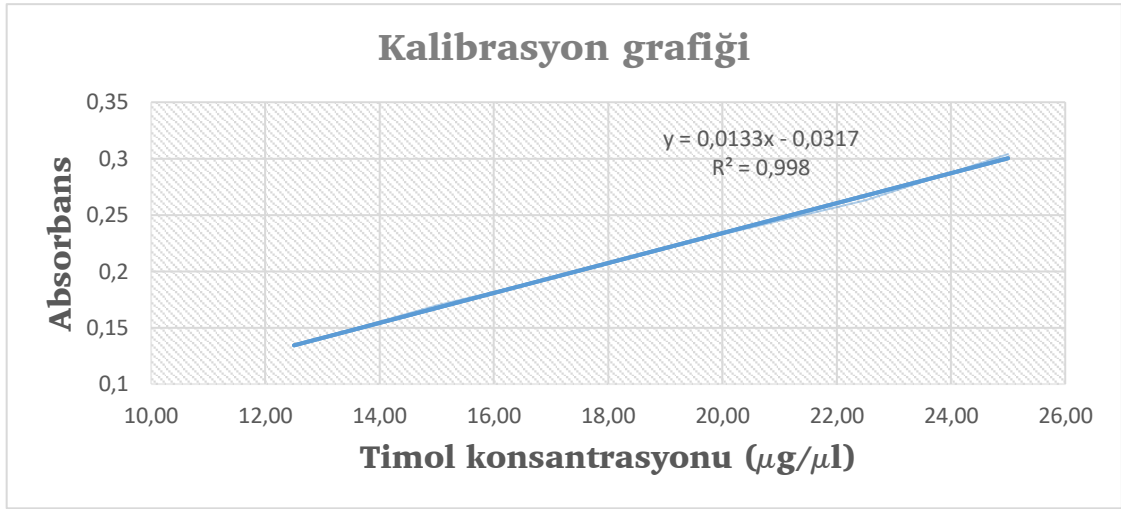
TKNP'lerin partikül boyutu analizi, PDI ve zetapotansiyel (mV) ölçümleri Nano ZSP (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalama partikül çapını belirlemek için kullanılan DLS analizi 173°'lik bir saçılma açısı kullanılarak 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Çoklu saçılma etkilerinden kaçınmak için, nanopartiküller saf suyla seyreltilmiş ve 10-15 dakika ultrases dalgasına maruz bırakıldıktan sonra ölçülmüştür. %1 (v/v) asetik asit ve saf suyun viskozitesi sırasıyla 1,333 ve 0,890 cP olarak tanımlanmıştır. KNP'lerin kırılma indisi ise el refraktometre kullanılarak 1,52 olarak ölçülmüştür (OPTI, Bellingham Stanley, Farnborough, İngiltere). Sonuçlar 3 ölçümün ortalaması alınarak verilmiştir [86]. Nanopartiküllerin zetapotansiyeline pH'nın etkisini belirlemek için liyofilize edilmiş KNP ve TKNP'ler (10 mg/mL) gün boyunca saf su içinde bekletilmiştir.

Su içerisinde partiküllerin homojen dağılmasını sağlamak için 3 saniye sonikasyon, 7 saniye beklenerek toplamda 2 dakika (60W) ultrases işlemi uygulanmıştır. Daha sonra 0,05 N NaOH ve 0,05 N HCl kullanılarak tampon çözeltileri hazırlanmış ve farklı pH (3 ile 9 arasında) değerlerindeki tampon çözeltileri içerisindeki timol yüklü olan ve olmayan nanopartiküllerin zetapotansiyelleri Nano ZSP (Malvern, İngiltere) ile ölçülmüştür.

3.2.5 Enkapsülasyon Etkinliği (EE)

Enkapsülasyon etkinliği hem spektrofotometrik hem de kromatografik olarak ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümde ilk olarak, TKNP'den 100 µL alınarak 4,9 mL 1 M'lık HCl çözeltisi ile karıştırılmıştır. Ardından kaynayan ultrasonik su banyosunda (Daihan, WUC-D10H, Kuzey Kore) 30 dakika tutulmuştur. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra soğumaya bırakılan karışıma 1 mL etanol ilave edildikten sonra ortam sıcaklığında 5 dakika boyunca 10,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatantın absorbansı, 250 ila 400 nm arasındaki dalga boylarında spektrofotometre'de (Shimadzu, UV-1800, Japonya) ölçülmüştür. Maksimum absorbans 275 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Timol miktarının hesabı için saf timol (12,5 – 15 - 17,5 – 20 - 22,5 - 25 µg/µl) etanol ve HCl içinde uygun bir kalibrasyon eğrisi ile $R^2=0,998$ ($y=0,0133x - 0,0317$) çizilmiştir. Şekil 3. 3'te timolün kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Kontrol için timol içermeyen KNP'ler kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği (EE, %), aşağıdaki denklem (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır [13,93].

$$EE (\%) = \frac{\text{Kapsüllenmiş timol konsantrasyonu}}{\text{Toplam timol konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3.3)$$



Şekil 3.3 Timolün kalibrasyon eğrisi

Timol yüklü nanopartiküllerde kapsüllenen timolün enkapsülasyon etkinliğini belirlemek ve UV spektrofotometre ile kıyaslamak için gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi (GC-MS-QP2010 (Shimadzu, Japonya)) tekniği de kullanılmıştır. Bu amaçla timol konsantrasyonunun tespiti için Hu ve ark. (2018) tarafından belirlenen şartlar modifiye edilerek kullanılmıştır [94]. GC-MS analizlerinde kromatografik ayırım için Rtx-5MS silika kapiler kolon (30 m×0,25 mm (iç çap) 0,25 μm) (Restec,Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Gradyan analizi için 40 °C (3 dak.); 40–176 °C (8 °C/dak.); ve 176 °C (20 dak.). sıcaklık programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjektörün sıcaklığı 150 °C'de sabit tutulup, basınç değeri ve doğrusal hız sırasıyla 95,8 kPa ve 47,1 cm/s ve taşıyıcı gaz akış hızı 1,71 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. GC-MS arayüz sıcaklığı ve iyon kaynağı sıcaklığı sırasıyla 280 °C ve 230 °C'dir. Kütle spektrometresi seçili iyon izleme modunda elektron iyonizasyon dedektörünün voltajı 70 eV'a ayarlanmış ve veriler 35-550 m/z aralığında toplanmıştır. Analizler her numune için iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Enkapsüle edilen timol miktarı Cui ve ark. (2018) tarafından belirlenen yöntem ile belirlenmiştir [95]. Buna göre KNP'lere yüklenen timol içeriğinin belirlenmesi amacıyla 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm konsantrasyonlarda etanol ile hazırlanan timol çözeltileri GC-MS'e enjekte edilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Daha sonra TKNP'leri, 40 dakika boyunca 4 °C' de ve 10000 x rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı etanol ile seyreltilerek GC-MS ile analiz edilmiştir. Nanoenkapsülasyon sonucu kapsüllenmeyen timol miktarı, timol pik alanının standart eğrisi ile hesaplanmıştır [95,96]. Enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki (3.4) eşitliği ile hesaplanmıştır.

$$GC - EE (\%) = \frac{\text{Toplam timol kons.} - \text{Kapsülenmeyen timol kons.}}{\text{Toplam timol kons.}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.6 Antioksidan Aktivitenin (AOA) Belirlenmesi

Kapsüllenmiş TKNP'lerin antioksidan aktivitesi, Shetta ve ark. (2019) tarafından düzenlenen DPPH serbest radikal temizleme yöntemi kullanılarak incelenmiştir [17]. İlk olarak, önceden belirlenmiş miktarlarda saf timol, KNP'ler ve TKNP'ler 2 mL (metanol DPPH solüsyonu (0,05mM)) içerisinde dağıtılmış ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca karanlıkta saklanmıştır. Daha sonra UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu, UV-1800, Japonya) kullanılarak 517 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Kör olarak metanol kullanılmıştır. DPPH(%) yakalama aktivitesi denklem (3.5) kullanılarak elde edilmiştir. DPPH(%) karşı konsantrasyonlar grafiğe aktararak IC50 (radikal temizleme etkinliğinin % 50'sini sağlayan numune konsantrasyonu) değeri belirlenmiştir. Elde edilen IC50 değerleri Troloks eşdeğeri ile kıyaslanmıştır [97].

$$\%DPPH = \frac{\text{Örnek absorbansı} - \text{Kör absorbansı}}{\text{Örnek absorbansı}} \times 100 \quad (3.5)$$

Troloks eşdeğeri hesaplanırken yukarıda belirlenen yöntem trolox standardı için 50-75-100-150-175-200 ppm'de hazırlanmıştır. Troloks için kalibrasyon grafiği çizilerek IC50 değeri belirlenmiştir. Böylece timol yüklü olan ve olamayan KNP'ler ile Troloks değeri kıyaslanmıştır.

3.2.7 Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

TKNP'lerin antibakteriyel aktivitesi, dört bakteri suşuna karşı (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028) disk difüzyon testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Disk difüzyon testinde öncelikle kâğıt disklere partiküllerin emdirilmesi, sonrasında duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olma seviyesinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Taze bakteri kültürü elde etmek için, dondurularak muhafaza edilen bakteriyel kültürler Nutrient Broth (Merck, Almanya) ile 37 °C'de 24 saat boyunca peş peşe iki kez aktifleştirilmiştir. Aktif hale getirilmiş bakteri suşları Nutrient Agar (Merck, Almanya) besiyerlerine ($\sim 10^5$ – 10^6 kob/mL) hedef bakteri sayısında ilave edildikten sonra petri kaplarına dökülerek katılaştırılmıştır. Daha sonra TKNP (20 μ L) emdirilmiş kâğıt diskler (90 mm) üzerinde katı besiyerleri üzerine yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak timol içermeyen KNP ve saf su emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Petri kapları 37 °C 'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonu ölçülmüştür [98].

Timol yüklü nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesi, sıvı besiyeri içerisinde 2 farklı bakteriye karşı zamana bağlı mikroorganizma canlılığı/ölümü test edilerek belirlenmiştir. Böylelikle timol yüklenmiş ve timol içermeyen KNP'lerin bakteriler üzerine etkisi belirlenmiştir. TKNP'lerin antimikrobiyal etkisi, Törnük ve ark. (2018) tarafından özetlenen yöntemle, inokülüm düzeyinde ($\sim 10^6$ kob/mL) taze mikrobiyal kültür içeren pH 7 tampon çözeltisi (KH_2PO_4 (Merck, Almanya) ve Na_2HPO_4 (Merck, Almanya)) içerisinde 24 saat boyunca takip edilmesi suretiyle belirlenmiştir [99]. Öncelikle *L. monocytogenes* ATCC 19118 ve *S. Typhimurium* ATCC 14028 bakteriyel kültürler 37 °C'de 24 saatte aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen bakteriler 6 mL steril besiyeri içerisine $\sim 10^6$ kob/mL düzeyinde inoküle edilmiş ve üzerine %1 ve %2 (v/v) oranında TKNP ve KNP ilave edilmiştir. Sıvı besiyeri 1 dk vortekste karıştırılarak nanopartiküllerinin besiyeri içerisine iyice dağılması sağlanmıştır. Ardından mikroorganizma içeren sıvı besiyerinden belli periyotlarda (0. ve 24. saatler) örnekler alınmıştır.

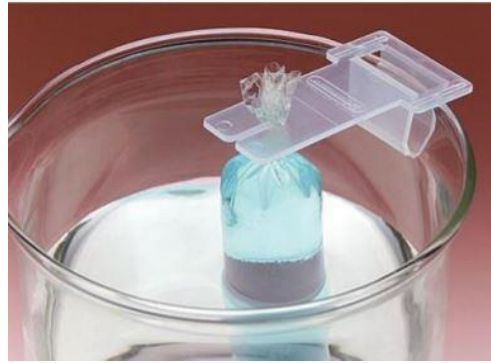
Örneklerin Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, Almanya) çözeltisi ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Bu dilüsyonlardan uygun katı besiyerlerine (Nutrient Agar) yayma ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat süreyle 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonucunda gelişen koloniler sayılmıştır. Koloni sayıları logaritmik değerlere çevrilmiş ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

3.2.8 *In vitro* Salım

TKNP'lerin farklı pH değerlerindeki (pH 3 – asetat tamponu ve 7,4 – fosfat tamponu) *in vitro* salımları incelenmiştir. Şekil 4.24' te *in vitro* salım ortamı gösterilmektedir. Bu amaçla 10 mL TKNP bir diyaliz torbasına (12000- 14.000 KDa) konulmuş ve içerisine 40 mL fosfat veya asetat tamponu ilave edilerek 37 °C 'de hafif sallamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Salım için 100 µl örnek alınmış ve eşit hacimde taze salım ortamının eklenmesiyle analiz için spesifik örnekleme zaman aralıklarında spesifik bir salım ortamı sağlanmıştır. Nanopartikülde kapsüllenmiş salım ortamı (mL) hacmindeki toplam kümülatif timol miktarı (absorbans) sırasıyla 275 nm'de UV-vis spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Her bir zaman aralığında (1, 2, 4, 6, 18, 24, 48,72 saat, Mt) salınan kümülatif timol absorbasının NP'lerde kapsüllenene timolün başlangıç absorbasına (M₀) oranı ile temsil edilmiş ve serbest bırakılan kümülatif timol yüzdesi 3.6 denkleminde verildiği şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Kümülatif salım yüzdesi} = \sum_{t=0}^t \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (3.6)$$



Şekil 3.4 *in vitro* salım ortamı

3.2.9 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

KS, timol, KNP ve TKNP'nin moleküler karakterizasyonunun yapılması amacıyla FTIR (Bruker Tensor 27, Bremen, Almanya) spektroskopisi kullanılmıştır. Örnekler için ölçümler oda sıcaklığında $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki frekanslarda, 16 taramalı ve 4 cm^{-1} çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

3.2.10 Raman Spektroskopisi Analizi

TKNP'lerin moleküler karakterizasyonu için DXR Akıllı Raman Spektrometresi (Thermo Fisher Co., Ltd, Amerika) kullanılmıştır. Test parametreleri: deneysel veri alımının dalga boyu aralığı $200 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$; lazer gücü 150 mW; uyarma dalga boyu 780 nm'dir.

3.2.11 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

TKNP'lerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobuyla analiz edilmiştir (SEM, LEO 440 Stereoscan, İngiltere). Öncelikle örnekler liyofilize edilmiş ve sonrasında dijital SEM mikrografları alınmıştır.

3.2.12 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

TKNP'lerin termal özellikleri DSC cihazı (Q100, TA Instruments Inc., ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Alüminyum DSC kapları içerisine nanopartikül örneği (5-10 mg) konulmuş ve $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{dak}$. ısıtma oranı ile N atmosferinde $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtılmıştır. Kontrol olarak boş pan kullanılmıştır. Örneğe verilen enerji (mW), sıcaklık ve zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir [100].

3.2.13 Verim Yüzdesi (YP) ve Şişme İndeksi (SI)

Verim yüzdesi, liyofilize edilen nanopartiküllerin başlangıç kuru madde ağırlığıyla kıyaslamak için yapılan bir analizdir.

Verim yüzdesi (YP), (3.7) eşitliği yardımıyla hesaplanır.

Burada W_1 , geri kazanılan kurutulmuş NP'lerin ağırlığı iken W_2 , kullanılan materyallerin başlangıçtaki kuru ağırlığının toplamıdır [101]. Başlangıç kuru ağırlığı ise KS, timol ve TPP'nin ağırlığıdır.

Nanopartiküllerin verim yüzdesinin hesaplanması Denk. (3.7)'de verilmiştir:

$$YP (\%) = \frac{W1}{W2} \times 100 \quad (3.7)$$

Şişme indeksi (SI) çalışması başlangıçta tartılan (W_b) liyofilize nanopartiküller üzerinde gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş TKNP'ler 24 saat boyunca ortam sıcaklığında saf suya daldırılmış ve süre sonunda şişmiş ağırlık (W_f) yüzey suyunun yavaşça uzaklaştırılmasından sonra ölçülmüştür [17]. Şişme indeksi (SI) daha sonra aşağıdaki Denk. (3.8) ile belirlenmiştir.

$$SI (\%) = \frac{W_f - W_b}{W_b} \quad (3.8)$$

3.2.14 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı, deneme deseni ve analiz modellemesini oluşturmak için kullanılmıştır. Deneysel tasarımın oluşturulmasında Design Expert 7.0 (State-Ease Inc., ABD) programı kullanılmıştır. KNP'ler oluşturulurken optimum noktaları belirleme prosesinde KS ve TPP konsantrasyon parametreleri kullanılarak program tarafından önerilen ön deneme koşullarına göre deneyler yapılmış olup, belirlenen cevap değişkenlerinin analiz sonuçları Design Expert programına aktarılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda 5 bağımsız değişken (KS, timol, T80 ve TPP konsantrasyonu ile sıcaklık derecesi) ve 3 yanıt için (boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve EE (%)), 3 tekerrürlü ve 3 paralelli olarak çalışılmıştır.

Optimize edilmiş nanopartikül formülasyonu Design Expert yazılımı ile sayısal nokta tahmin yöntemi uygulanarak minimum partikül boyutu, sıfırdan en uzak zetapotansiyel ve en yüksek EE kriterleri temelinde seçilmiştir.

Deneysel veriler ile hesaplanan değerlerin birbiri ile ne derece ilişkilendirildiğini belirlemek için varyans analizi (ANOVA, Analysis of variance) yapılmıştır. Modele ait regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon sayısı (adj- R^2) değerleri hesaplanmıştır.

ANOVA ile her bir faktörün lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerinin cevap üzerindeki önemleri % 95 güven aralığında Fischer's (F-Test) testi ile araştırılmıştır. Önemli bulunan varyasyon kaynakları ortalamaları "Duncan Çoklu Karşılaştırma" testine tabi tutulmuştur. Maksimum regresyon katsayısını sağlayan modeller dikkate alınmış ve özellikle optimizasyon çalışmaları kapsamında interaksiyon modelleri tercih edilmiştir. Her yanıt değişkeni (Y) için regresyon denklemi (3.9) tanımlanmıştır.

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_4 + A_5X_5 + A_6X_1X_2 + A_7X_1X_3 + A_8X_1X_4 + A_9X_1X_5 + A_{10}X_2X_3 + A_{11}X_2X_4 + A_{12}X_2X_5 + A_{13}X_3X_4 + A_{14}X_3X_5 + A_{15}X_4X_5 \quad (3.9)$$

Burada Y, bağımlı değişkenlerin ölçülen tepkisidir, X₁, X₂, X₃, X₄ ve X₅ bağımsız değişkenlerdir, A₀ kesişimdir; A₁ ile A₁₅ doğrusal katsayılarıdır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Optimizasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Nanopartikül eldesinde duvar materyali olarak yüksek, orta ve düşük molekül ağırlığına sahip KS kullanılabilmektedir. O'Callaghan ve Kerry (2016) yaptıkları çalışmada düşük molekül ağırlıklı (LMW) KS'yi, orta ve yüksek molekül ağırlıklı (MMW ve HMW) KS ile karşılaştırdıklarında daha küçük ortalama partikül boyutu (nm) elde etmişlerdir [102]. LMW ve HMW KS karşılaştırıldığında; LMW KS kullanılarak edilen nanopartiküllerin daha iyi çözünürlük, biyouyumluluk, biyoaktivite, biyobozunurluk ve hatta daha az toksisite gösterdiği de bildirilmektedir [65]. Bundan dolayı bu çalışmada duvar materyali olarak LMW KS kullanılmıştır.

Literatür incelendiğinde KS'nin pH'sı, molekül ağırlığı gibi sentezlenen KNP boyutunu, PDI ve zetapotansiyelini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir [86]. KS, 6,5 civarında bir pKa'da zayıf bir polielektrolittir. KS'nin protonasyon derecesi esas olarak çözelti pH'sı ile kontrol edilir. pH'nın KNP'lerin partikül boyutu üzerindeki etkisi, KS'nin amin grubunun protonasyon derecesinden kaynaklanır. Belirli bir pH değerinde KS amini daha fazla protonlanır ve anyonik TPP iyonları ile daha kuvvetli bir etkileşime girer. Bunun sonucunda da oluşan KNP'lerin daha küçük boyutta olduğu ifade edilmektedir [65]. Asetik asit çözeltisinde (%1'lik) çözündürülen KS'nin pH değeri 3,5-4 arasında değişmektedir. Bu çalışmada yapılan denemeler sonucunda KNP'lerin 4,5-5 pH arasında en düşük boyuta sahip olduğu bulunmuştur. Benzer pH aralığında partikül boyutunun daha düşük olduğunu bildiren birçok çalışma da mevcuttur. KNP'lerin sentezi üzerine pH'ın etkilerinin incelendiği bu çalışmalarda, en küçük KNP boyutuna pH değerinin 4,6 olduğunda ulaşıldığı bulunmuştur [65,86,103].

Ayrıca KNP'lerin zetapotansiyelinin ± 30 mV eşiğinin üzerinde olması durumunda orta derecede stabil kolloidler olarak kabul edildiği ve Brownian hareketi, partikül-partikül etkileşimleri ve van der Waals kuvvetleri gibi agregasyona neden olan kuvvetlere karşı daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir [103,104]. Bu çalışmada, elektropozitif küçük boyutlu KNP'lerin hazırlanmasını sağlamak için yüksek deasetilasyon derecesine sahip LMW KS kullanılmıştır. KS %1' lik asetik asit çözeltisi ile çözündürülmüş ve sonrasında 0,1 N NaOH ile pH değeri 4,6'ya ayarlanmıştır.

Fan ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, karıştırma hızının partikül büyüklüğü dağılımı üzerine etkisini araştırmış ve sonuçta partikül boyutu dağılımının karıştırma hızının 200 rpm'den 800 rpm'e arttırılmasıyla önemli ölçüde daraldığını bildirmiştir. Bununla birlikte, karıştırma hızının daha fazla yükseltilmesi agregasyona neden olmuştur. Elde edilen bulgular; yeterli karıştırma ve kesme kuvvetinin TPP'nin KS çözeltisi içinde dağılımını hızlandırdığı ve monodispersiteyi geliştirdiği, ancak yüksek hızda uzun süre karıştırmanın partiküller arasındaki itme kuvvetini yok ettiği ve partiküllerin agregasyonuna yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır [65]. Yapılan diğer bir çalışmada nanokapsüllerin oluşması için çapraz bağlayıcı ajanın ilave edilmesi sırasında 1000 rpm'de karıştırma hızı kullanılarak en yüksek EE elde edilmiştir [93]. Bu araştırma sonuçları baz alınarak bu çalışmada karıştırma hızı TPP ilavesi sırasında 1000 rpm, diğer aşamalarda ise 500 rpm olarak belirlenmiştir.

Partikül büyüklüğü, yüzey yükü ve PDI, biyoaktif bileşik içeren taşıyıcı sistemlerin tasarlanması için dikkate alınan en önemli hususlardandır. Teorik olarak nanopartiküllerin ideal özelliklerini; en küçük boyut, sıfırdan en uzak yüzey potansiyeli ve en düşük PDI değerinde gösterir [105]. PDI, dispersiyon homojenliğinin bir göstergesidir ve 0 ile 1 arasında değişmektedir [106].

Biyoaktif bileşen yüklenecek KNP'lerin partikül boyutu (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerine etki eden en önemli parametreler, KS ve TPP konsantrasyonudur. Bundan dolayı KS ve TPP konsantrasyonunun belirlenmesi için ön denemeler yapılmıştır.

İlk ön denemede KS konsantrasyonu 2 noktada sabit tutularak farklı TPP konsantrasyonlarının nanopartiküllerin boyutu (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Partikül boyutunu artıran TPP konsantrasyonları elemine edilerek, agregasyona neden olmayan TPP konsantrasyonlarına KS konsantrasyonun etkisini belirlemek için de ikinci bir ön deneme yapılmıştır. İkinci ön denemede agregasyona neden olmayan TPP konsantrasyonlarına (0,15-0,45 ve 0,75 mg/mL) farklı KS konsantrasyonlarının (1,5-3-4,5 ve 6 mg/mL) etkisi araştırılmıştır. Elde edilen KNP'lerin boyutu (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri incelenmiştir. Ön deneme sonuçları esas alındığında, partikül boyutu (nm) ve PDI değeri düşük, zetapotansiyeli (mV) değeri ise sıfırdan en uzak olan KS (3 ve 6 mg/mL) ve TPP (0,15 ve 0,75 mg/mL) konsantrasyonu iyonik jelasyon yönetiminde kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.1.1 KS ve TPP Oranının Belirlenmesinde Kullanılan I. Deneme Tasarımı

Deneme tasarımında KS konsantrasyonu için 3 ve 6 mg/mL noktaları seçilmiştir. Literatürde benzer oranların kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur [20,107]. Böylelikle KS konsantrasyonunun fazla ya da az olmasının boyut (nm), zetapotansiyel (mv) ve PDI üzerine olası etkisi incelenmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda, 3 mg/mL üzeri ve 0,075 mg/mL altı TPP konsantrasyonlarında partiküllerde agregasyon meydana geldiği ve oldukça büyük boyutlu partiküllerin oluştuğu görülmüştür. Şekil 4.1 'de agregasyon meydana geldiği kitosan partikülleri gösterilmiştir. Bu yüzden deneme tasarımında 0,075 ve 3 mg/mL arasındaki 3- 1,5- 1- 0,75- 0,5- 0,3- 0,15- 0,075 mg/mL TPP konsantrasyonları KNP'lerin üretiminde kullanılmıştır.



Şekil 4.1 Kitosan partiküllerinin agregasyonu

Tablo 4.1’de I. deneme tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri gösterilmiştir. Bu noktaların KNP’lerin boyutu (nm), zetapotansiyeline (mV) ve PDI üzerine olan etkisi incelenmiştir.

Tablo 4.1 I. deneme tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri

Semboller	Bağımsız Değişkenler	Seviyeler
X1	Kitosan (mg/L) (Nümerik faktör)	3 6
X2	TPP (mg/mL) (Nümerik faktör)	3 1,5 1 0,75 0,5 0,3 0,15 0,075

Farklı kitosan ve TPP konsantrasyonları ile edilen patiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 I. deneme tasarımı ile elde edilen nanopartiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri

Deneme noktaları	X ₁	X ₂	Boyut (nm)	PDI	Zetapotansiyel (mV)
1	3	3,0	2521	0,87	24,2
2	3	1,5	1680	0,81	38
3	3	1,0	225	0,42	16,5
4	3	0,75	264	0,46	17,8
5	3	0,5	389	0,48	13,7
6	3	0,3	388	0,49	18,5
7	3	0,15	570	0,52	20,1
8	3	0,075	812	0,53	11,7
9	6	3,0	1702	0,87	16,3
10	6	1,5	1019	0,77	26,1
11	6	1,0	652	0,58	16,4
12	6	0,75	320	0,5	18,7
13	6	0,5	400	0,53	15,9
14	6	0,3	462	0,53	10,4
15	6	0,15	909	0,7	19,7
16	6	0,075	1768	0,73	14,5

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), PDI değeri; Polidispers indeks ifade etmektedir

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, oluşturulan deneme tasarımında yapılan analizler sonucunda boyut 225-2521 nm, zetapotansiyel 10,4-38 mV ve PDI 0,42-0,87 arasında bulunmuştur. TPP konsantrasyonu 0,075 mg/mL altında olduğunda reaksiyon çözeltisi görünür opaklık olmadan berrak bir çözelti şeklini almıştır. Bu durum ortamda KS ile çapraz bağ oluşumu için yeterli TPP olmadığını göstermektedir. TPP konsantrasyonu 0,075 mg/mL’den 0,75 mg/mL’ye çıkartıldığında KS ve TPP arasında agregasyon olmadan çapraz bağlanma gerçekleşmiş ve daha düşük boyutlarda nanopartiküller elde edilmiştir. Tablo 4.2 incelendiğinde, TPP konsantrasyonu 1 mg/mL’den 3 mg/mL’ye kadar artırılması sonucunda partikül boyutunun gittikçe yükseldiği görülmektedir.

TPP konsantrasyonu 3 mg/mL üstünde olduğunda, partiküller sıfıra yakın yüzey zetapotansiyeline sahip oldukları için karıştırma sırasında stabilitesini koruyamamış ve kümeleşme gerçekleşmiş olabilir. Bunların sonucunda bulanık ve büyük agregasyon gözlemlenmiştir. Fan ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlarda KS veya TPP ile hazırlanan KNP'lerin özellikleri incelenmiş ve partikül boyutunun KS veya TPP konsantrasyonunun artmasıyla arttığı gösterilmiştir. Zetapotansiyelinde ise protonlanmış amino gruplarının TPP anyonları tarafından nötralizasyonu nedeniyle azalma olduğu ifade edilmiştir [65]. Tablo 4.2'de KS konsantrasyonu 3 mg/mL olduğunda 6 mg/mL değerine göre sıfıra daha yakın zetapotansiyel ve düşük PDI değerleri elde edildiği görülmektedir. De Pinho Neves (2014) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar rapor edilmiştir [28].

Farklı TPP ve KS konsantrasyonları ile oluşturulan faktöriyel dizayn deneme tasarımının oluşan nanopartiküllerin partikül boyutu üzerindeki etkisini gösteren varyans analizi sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir.

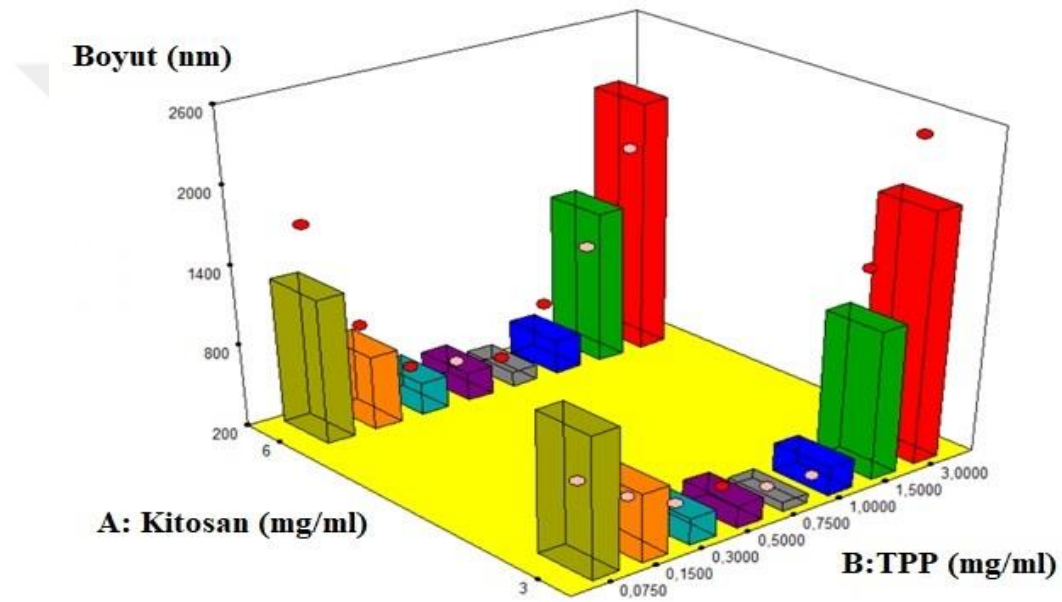
Tablo 4.3 I. deneme tasarımında partikül boyutu (nm) üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	5825697	728212,1	4,414811	0,0328
X1	9168,063	9168,063	0,055582	0,8204
X2	5816528	830932,6	5,037558	0,0245
Kalıntı	1154632	164947,5		
Düzeltilme Toplamı	6980329			
R² = 0,8346; Düzeltilmiş R² = 0,6455				

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p<0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir.

Deneme tasarımında elde edilen veriler incelendiğinde (Tablo 4.3), KS konsantrasyonunun boyut üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur (p>0,05).

Bu durum, TPP konsantrasyonuna bağlı olarak boyutun değişkenlik göstermesi ile açıklanabilir. Diğer bir ifadeyle, KS konsantrasyonu 3 mg/mL iken TPP konsantrasyonunun artmasıyla boyut önce artma eğilimi göstermekte ve daha sonra azalmaktadır. KS konsantrasyonu 6 mg/mL olduğunda ise TPP konsantrasyonunun artmasıyla boyutta önce azalma, daha sonra artma eğilimi görülmektedir. Diğer taraftan, TPP konsantrasyonunun partikül boyutu üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Uygulanan deneme tasarımında oluşturulan modelin boyut (nm) üzerine etki grafiği Şekil 4.2' de gösterilmektedir.



Şekil 4.2 I. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin boyutuna(nm) etkisi

KS konsantrasyonu sabit tutulduğunda, TPP konsantrasyonunun 1 mg/mL'nin üzerine çıkması durumunda boyut artarken, TPP konsantrasyonu 0,075 mg/mL'den 0,75 mg/mL'ye çıkması ile nanopartiküllerin boyutları azalmaktadır. TPP konsantrasyonu 0,75 mg/mL'nin üzerine çıkması durumunda ise partikül boyutunda artış olduğu görülmekte, özellikle KS:TPP oranının 3:1'den fazla olması durumunda partikül boyutlarındaki artış çok daha dramatik olmaktadır. Benzer sonuçlar KS:TPP oranının 3:1'den 1:1'e çıkartıldığında KNP'lerde agregasyon gerçekleştiğini bildiren Sullivan ve ark. (2018) tarafından da bulunmuştur [86].

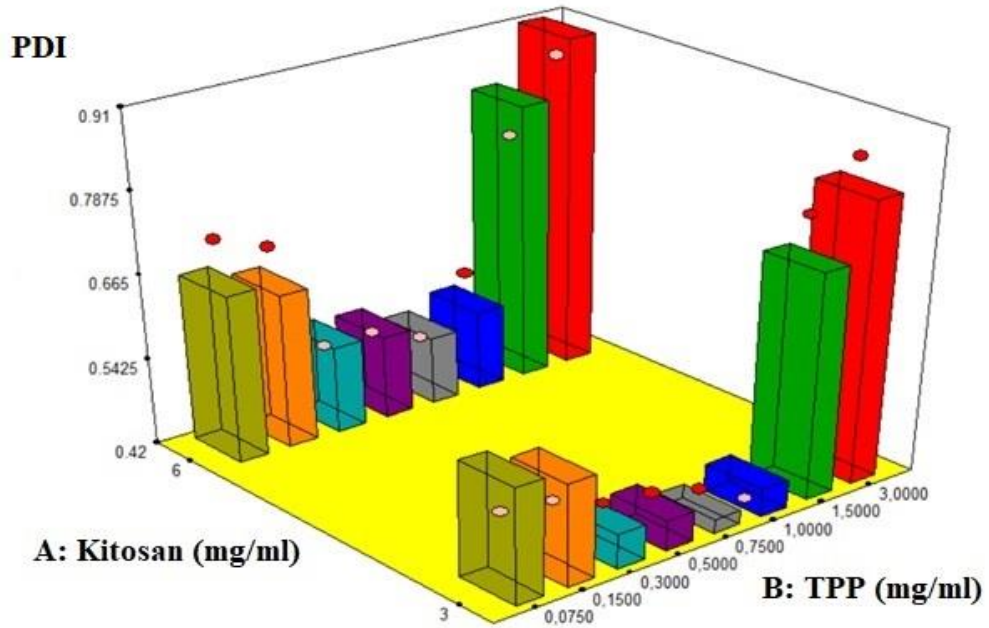
KS:TPP oranının artmasıyla belli bir seviyeden sonra partiküllerde birleşme ve çökme meydana getirmekte bu da partiküllerinin boyutlarında artışlara neden olduğunu göstermektedir. TPP konsantrasyonunun artması belli bir seviyeye kadar boyutu azaltırken, minimum seviyeye ulaştıktan sonra TPP konsantrasyonunun artırılması agregasyona neden olmaktadır. Çapraz bağlama yoğunluğunu ve nanopartiküllerin kararlılığını indükleyen aşırı miktardaki TPP'den gelen polianyon konsantrasyonudur [108]. TPP'nin belli bir konsantrasyonu aşması durumunda partikül-partikül etkileşimi (köprüleme etkileri) ile agregasyon oluşumunun gerçekleştiği düşünülmektedir [103]. TPP konsantrasyonunun fazla olması durumunda, bir KS molekülünün çok fazla TPP molekülü ile çapraz bağlanması ve bunun partikül boyutunda artışa neden olmasıyla açıklanabilir [96]. Ayrıca, KS:TPP oranı maksimum ve minimum seviyelerde olduğunda partikül boyutları en yüksek seviyeye çıkmaktadır. KS:TPP oranı en yüksek 3:3, en düşük 6:0,075'tir ve sırasıyla partikül boyutları 2521 ve 1768 nm'dir. Farklı KS ve TPP konsantrasyonları ile oluşturulan faktöriyel dizayn deneme tasarımının oluşan nanopartiküllerin PDI değeri üzerindeki etkisini gösteren varyans analizi sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4 I. deneme tasarımında PDI değeri üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	0,3256	0,0407	10,2321	0,0030
X1	0,024806	0,024806	6,236364	0,0412
X2	0,300794	0,042971	10,80292	0,0028
Kalıntı	0,027844	0,003978		
Düzeltilme Toplamı	0,353444			
R²=0,9212; Düzeltilmiş R²=0,8312				

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p< 0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir.

Deneme tasarımımda elde edilen veriler incelendiğinde (Tablo 4.4); PDI sonuçları için yapılan ANOVA testinde KS ve TPP konsantrasyonunun PDI üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). Uygulanan deneme tasarımımda oluşturulan modelin PDI üzerine etki grafiği Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3 I. deneme tasarımımda kullanılan, KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin PDI'si üzerine etkisi

Şekil 4.3 incelendiğinde, TPP konsantrasyonunun sabit tutulup KS konsantrasyonunun artırılmasıyla birlikte PDI değeri de artmaktadır. Bu durum partiküllerin agregasyonuna bağlanabilir. Aynı şekilde KNP oluşması için yeterli olmayan düşük konsantrasyonlardaki TPP değerlerinde de PDI değeri artış göstermektedir.

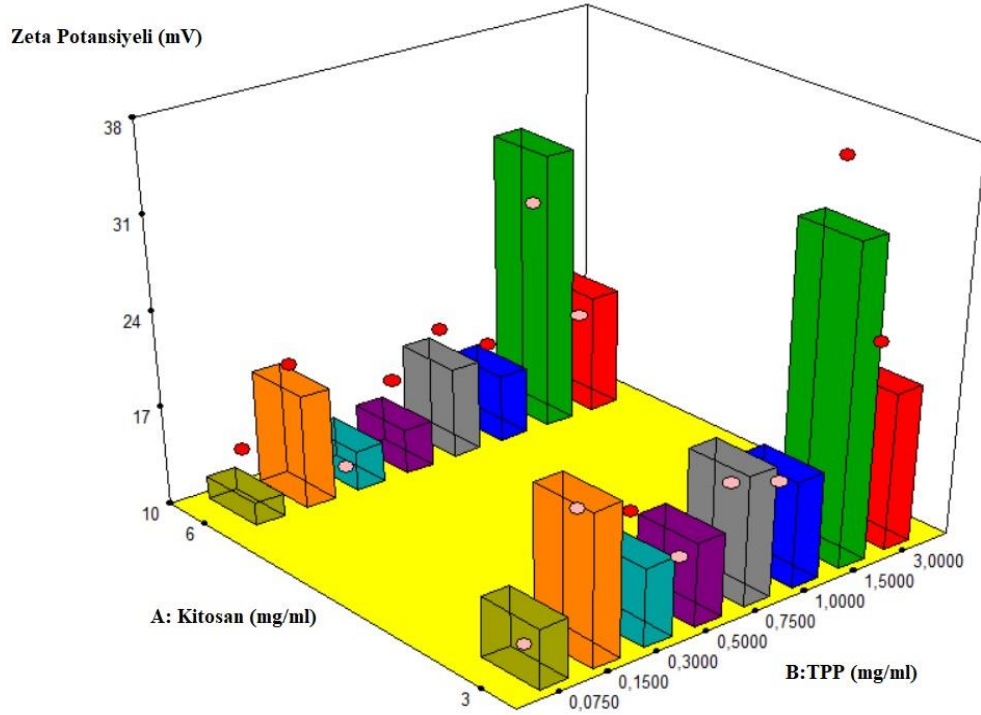
Farklı KS ve TPP konsantrasyonları ile oluşturulan faktöriyel dizayn I. deneme tasarımımda oluşan nanopartiküllerin zetapotansiyel (mV) üzerindeki etkisini gösteren varyans analizi sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5 I. deneme tasarımında zetapotansiyel üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	535,535	66,94188	4,259768	0,0359
X1	31,64063	31,64063	2,013414	0,1989
X2	503,8944	71,98491	4,580676	0,0313
Kalıntı	110,0044	15,71491		
Düzeltilme Toplamı	645,5394			
R²= 0,8296; Düzeltilmiş R²=0,6348				

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p< 0,05 istatistiksel önemi gösterir,

Partiküllerin zetapotansiyel (mV) değerleri üzerinde KS ve TPP konsantrasyonlarının etkisini belirlemek amacıyla yapılan ANOVA testinde, KS konsantrasyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0,05), TPP konsantrasyonunun etkisi ise istatistiksel önemli (p<0,05) olduğu tespit edilmiştir. Deneme tasarımı ile oluşturulan modelin partiküllerin zetapotansiyel değeri (mV) üzerine etkisi Şekil 4.4' te gösterilmektedir.



Şekil 4.4 I. deneme tasarımında kullanılan, KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin zetapotansiyel (mV) üzerine etkisi

Şekil 4.4 incelendiğinde, 1,5 ile 0,15 mg/mL TPP konsantrasyonunda zetapotansiyelin (mV) sıfırdan en uzak olduğu görülmektedir. Belirlenen aralıkta KS konsantrasyonunun artması partiküllerin zetapotansiyelini sıfıra yaklaştırmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli değildir ($p>0,05$). Bu bulgular, KS:TPP oranının 3:1'den 6:1'e çıkmasıyla KNP'lerin zetapotansiyelinin sıfıra yaklaştığını rapor eden Sullivan ve ark. (2018) tarafından da desteklenmektedir [86].

4.1.2 Kitosan ve TPP Oranının Belirlenmesinde Kullanılan II.

Deneme Tasarımı

Birinci deneme tasarımında, 2 farklı kitosan (3 ve 6 mg/mL) ve 3 farklı TPP konsantrasyonunun nanopartiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu tasarımda elde edilen sonuçlar baz alınarak, mikropartikül (1000 nm'den büyük) oluşumuna neden olan KS ve TPP konsantrasyonlarının elemine edilmesi ile yeni bir deneme planı tasarlanmıştır.

Deneme tasarımımda KS konsantrasyonu için 1,5-3-4,5 ve 6 mg/mL noktaları, TPP konsantrasyonu için ise mikropartikül oluşturmeyan konsantrasyonlar (0,15, 0,45 ve 0,75 mg/mL) kullanılmıştır. Bu deneme tasarımıyla KS konsantrasyonunun fazla ya da az olmasının nanopartiküller üzerine olan etkisi incelenmek istenmiştir (Tablo 4.6). Literatürde farklı konsantrasyonlar ve parametreler kullanarak bu etkileri inceleyen birçok çalışma mevcuttur [13,67,93]. Ayrıca, düşük boyut ve PDI değeri ile sıfırdan uzak zetapotansiyele yol açan KS ve TPP konsantrasyonu aralığı belirlenmiştir.

Tablo 4.6 II. deneme tasarımıda kullanılan faktörler ve seviyeleri

Semboller	Bağımsız Değişkenler	Seviyeler			
X1	Kitosan (mg/mL) (Nümerik faktör)	1,5	3	4,5	6
X2	TPP (mg/mL) (Nümerik faktör)	0,15	0,45	0,75	

Farklı KS ve TPP konsantrasyonları ile edilen partiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7 II. deneme tasarımı ile elde edilen nanopartiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve PDI değerleri

Deneme noktaları	X ₁	X ₂	Boyut (nm)	Zetapotansiyel (mV)	PDI
1	1,5	0,15	552	31	0,55
2	3	0,15	414	39,6	0,58
3	4,5	0,15	773	41,6	0,61
4	6	0,15	909	43,6	0,74
5	1,5	0,45	330	26,4	0,44
6	3	0,45	400	38,4	0,54
7	4,5	0,45	492	41	0,56
8	6	0,45	805	43,3	0,6
9	1,5	0,75	254	19,5	0,36
10	3	0,75	264	32,7	0,46
11	4,5	0,75	332	40,9	0,48
12	6	0,75	340	42,3	0,5

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), PDI değeri; Polidispers indeks ifade etmektedir

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi, II. deneme tasarımıyla oluşturulan nanopartiküllerin boyutları, zetapotansiyelleri ve PDI’leri sırasıyla 254-909 nm, 19,5-43,6 mV ve 0,36-0,74 arasında bulunmuştur.

Farklı KS ve TPP konsantrasyonları ile oluşturulan faktöriyel dizayn II. deneme tasarımının partiküllerin boyutları (nm) üzerindeki etkisini gösteren ANOVA testi sonuçları Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8 II. deneme tasarımında partikül boyutu (nm) üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	498779,1	99755,83	11,15897	0,0054
X1	178542,2	178542,2	19,97223	0,0042
X2	265720,5	265720,5	29,72425	0,0016
X1X2	30470,4	30470,4	3,408505	0,1144
X1²	22102,08	22102,08	2,472402	0,1669
X2²	1944	1944	0,217461	0,6574
Kalıntı	53637,12	8939,519		
Düzeltilme Toplamı	552416,3			
R²=0,9029; Düzeltilmiş R²= 0,8220				

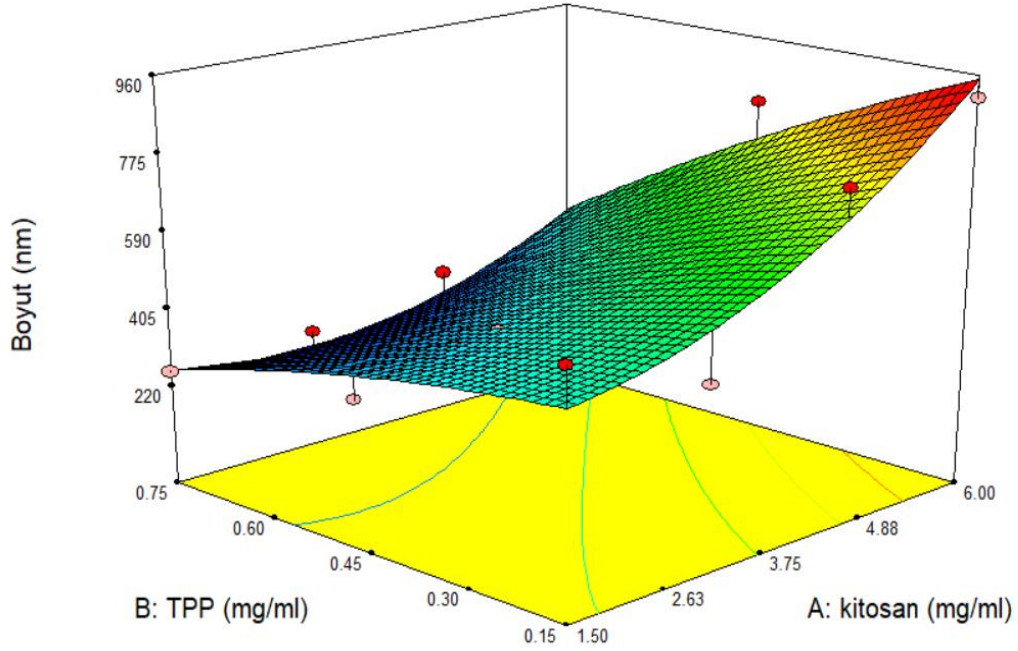
X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p< 0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir.

Tablo 4.8'e göre, KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin boyutuna tek başlarına etkileri istatistiksel anlamda önemli iken (p<0,05), KS ve TPP arasındaki interaksiyonun istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur (p>0,05). TPP konsantrasyonu varyans analizinde görüldüğü üzere (p<0,05) en önemli faktördür. Yapılan deneme çalışmasının R² değeri 0,9029 bulunmuştur. Yanıtlar için bu R² değeri 1'e oldukça yakındır, bu da bağımsız parametreler ve yanıtlar arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu deneme tasarımı sonucunda elde edilen regresyon Denk. (4.1) aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Boyut (nm)

$$\begin{aligned}
 &= 454.20833 - 15.12222 * X_1 + 122.5 * X_2 - 122.66667 \\
 &\quad * X_1X_2 + 19.07407 * X_1^2 - 300 * X_2^2
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

Şekil 4.5'te II. deneme tasarımında kullanılan KS konsantrasyonu (mg/mL) ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) boyut (nm) üzerine olan etkisini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.5 II. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) boyut (nm) üzerine olan etkisi

Belirlenen aralıklarda KS konsantrasyonu sabit tutulup, TPP konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte partikül boyutu artmaktadır (Şekil 4.5). TPP konsantrasyonu sabit tutulup, KS konsantrasyonunun artması da benzer şekilde partikül boyutunun artmasına neden olmaktadır. Rathi ve Gaikar (2017); KS-TPP hacimsel oranı sabit iken, KS konsantrasyonundaki artışın parçacıklar üzerindeki pozitif yükte genel bir artışa neden olduğunu ve bunun da KS molekülleri arasında elektrostatik itmeye ve dolayısıyla daha büyük bir parçacık boyutuna yol açtığını bildirmiştir. Yüksek KS konsantrasyonları birçok çekirdeğin oluşumuna yol açar. Bu çekirdekler KS zincirleri arasındaki itme nedeniyle daha yüksek büyüme oranlarına sahiptir. Bu yüzden, daha büyük boyutlarda KNP'lerin oluşumuna neden olmuş olabilirler [109].

Fan ve ark. (2012) iyonik jelasyon yöntemiyle KNP'lerin elde edildiği çalışmada, sabit KS konsantrasyonunda çözeltiye ilave edilen TPP hacmi 2,5 mL'den 3,3 mL'ye yükseltildiğinde KS ile TPP arasındaki artan çapraz bağlanmanın etkisiyle partikül boyutunda bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak TPP hacminin 3,5 mL'ye çıkartılması ile partikül boyutunun belirlenen aralıkta en yüksek seviyesine ulaştığı bildirilmiştir [65].

Farklı KS ve TPP konsantrasyonları ile oluşturulan faktöriyel dizayn II. deneme tasarımının, oluşan partiküllerin zetapotansiyel (mV) üzerindeki etkisini gösteren varyans analizi sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9 II. deneme tasarımında seçilen bağımsız değişkenlerin zetapotansiyel (mV) üzerine etkisini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	633,6867	126,7373	71,05106	< 0,0001
X1	479,9682	479,9682	269,0782	< 0,0001
X2	52,02	52,02	29,16328	0,0017
X1X2	33,856	33,856	18,98024	0,0048
X1²	65,80083	65,80083	36,88904	0,0009
X2²	2,041667	2,041667	1,144592	0,3258
Kalıntı	10,7025	1,78375		
Düzeltilme Toplamı	644,3892			

R²=0,9834; Düzeltilmiş R²= 0,9696

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p < 0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir.

Tablo 4.9'da görüldüğü gibi, KS ile TPP konsantrasyonunun KNP'lerin zetapotansiyel (mV) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05). KNP'lerin zetapotansiyel (mV) üzerine etki eden en önemli parametre ise KS konsantrasyonudur (p<0,0001).

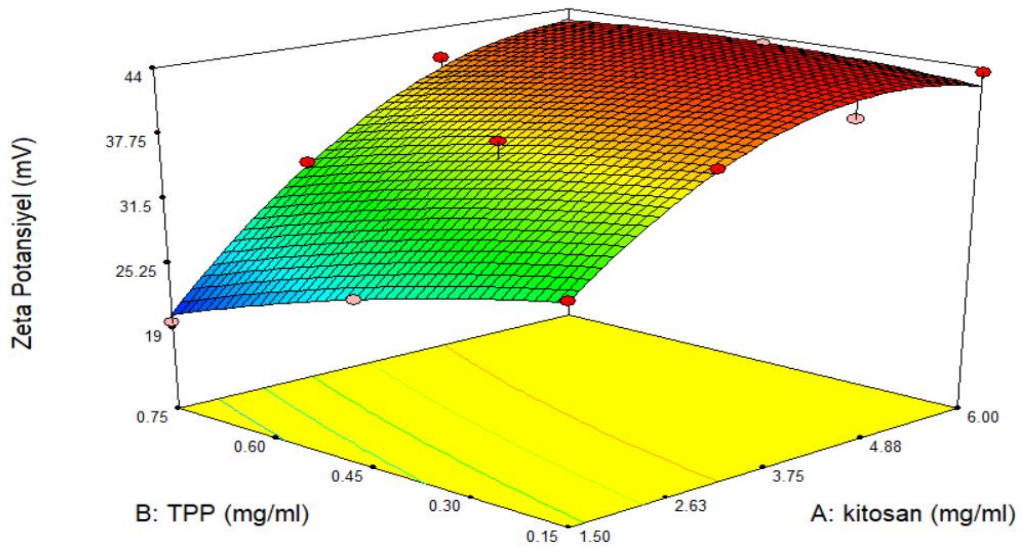
KS ve TPP arasındaki ilişkinin (X_1X_2) zetapotansiyel üzerine etkisi de istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($p=0,0048$, $p<0,05$). Ayrıca tasarım modelinin de istatistiksel anlamda önemli olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Yapılan deneme çalışmasının R^2 değeri 0,9834 bulunmuştur. Bu değer tasarımın doğru olarak kurulduğunu ve elde edilen değerlerin tasarımı desteklediğini göstermektedir. Bu deneme tasarımı sonucunda elde edilen regresyon denklemi (4.2) ise aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Zeta Potansiyel (mV)

$$= 20,18125 + 9,736667 * X_1 - 15,0833 * X_2 \quad (4.2)$$

$$+ 4,088889 * X_1X_2 - 1,04074 * X_1^2 - 9,72222 * X_2^2$$

Şekil 4.6, KS ve TPP konsantrasyonunun KNP'lerin zetapotansiyel değerleri üzerindeki etkisini gösteren yüzey grafiğini içermektedir.



Şekil 4.6 II. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) zetapotansiyel (mV) üzerine olan etkisi

Şekilde görüldüğü gibi, belirlenen koşullarda KS konsantrasyonu sabit tutulup TPP konsantrasyonu artırılırsa, zetapotansiyel (mV) azalmaktadır. Fan ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada benzer şekilde sabit KS konsantrasyonunda (10,0 mL kitosan çözeltisi, 0,5 mg/mL) TPP (0,5 mg/mL) hacminin 2,5 mL'den 3,5 mL'ye çıkartılmasıyla KNP'lerin zetapotansiyelinin azaldığını bildirmişlerdir [65].

Bununla birlikte, Şekil 4.6'da görüldüğü gibi TPP konsantrasyonunun sabit tutulup, KS konsantrasyonunun artırılmasıyla elde edilen nanopartiküllerin zetapotansiyeli de artmaktadır. Elde edilen bu bulgular, KS:TPP oranının 2:1'den 6:1'e artmasıyla nanopartiküllerin zetapotansiyelinin arttığını rapor eden Neves ve ark. (2014)'nın yaptığı çalışmayla uyumludur [28]. TPP konsantrasyonunun artmasıyla (sabit KS konsantrasyonlarında) zetapotansiyel değerinin sıfıra yaklaşması, KS'nin protanlanmış amino gruplarının negatif yüklü TPP polianyonları tarafından nötralize edilmesinden kaynaklanmış olabilir. Yüksek TPP konsantrasyonlarında oluşan agregasyon ise, nötralizasyon sonucu sıfıra yaklaşan zetapotansiyel değerlerinde karıştırma sırasında partiküllerin stabilitelerini kaybetmeleri ve partikül-partikül etkileşiminin artması sonucu meydana gelmiş olabilir.

KS ve TPP konsantrasyonunun birlikte artırılmasıyla nanopartiküllerin zetapotansiyeli artmaktadır. Hashad ve ark. (2016) hem KS konsantrasyonunu (0,1-0,3 % w/v) hem de TPP konsantrasyonunu (0,01-0,05 % w/v) artırarak zetapotansiyel üzerine etkisini incelediği çalışmada KS ve TPP konsantrasyonun birlikte artırıldığında zetapotansiyel değerinin sıfıra yaklaştığı sonucuna ulaşmıştır [88]. Bu çalışmada elde edilen bulgudan farklı olmasının nedeni, KNP oluşturulurken KS'nin pH'sının 6,2'ye kadar yükseltilmesi olabilir. Aynı çalışmada hem KS hem de TPP çözeltilerinin pH değerleri 3'ten 5'e yükseltilmiştir. Bu durum, incelenen tüm konsantrasyonlarda nanopartiküllerin yüzey yükünde genel bir azalmaya neden olmuş olabilir.

Farklı TPP ve KS konsantrasyonları ile oluşturulan faktöriyel dizayn II. deneme tasarımının oluşan partiküllerin PDI üzerindeki etkisini gösteren varyans analizi sonuçları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10 II. deneme tasarımında PDI üzerine seçilen bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	0,0981	0,01962	18,9871	0,0013
X1	0,039527	0,039527	38,25161	0,0008
X2	0,0578	0,0578	55,93548	0,0003
X1X2	0,00064	0,00064	0,619355	0,4612
X1²	0,000133	0,000133	0,129032	0,7317
X2²	0	0	0	1,0000
Kalıntı	0,0062	0,001033		
Düzeltilme Toplamı	0,1043			
R² = 0,9406; Düzeltilmiş R² = 0,8910				

X₁ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₂ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p < 0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir.

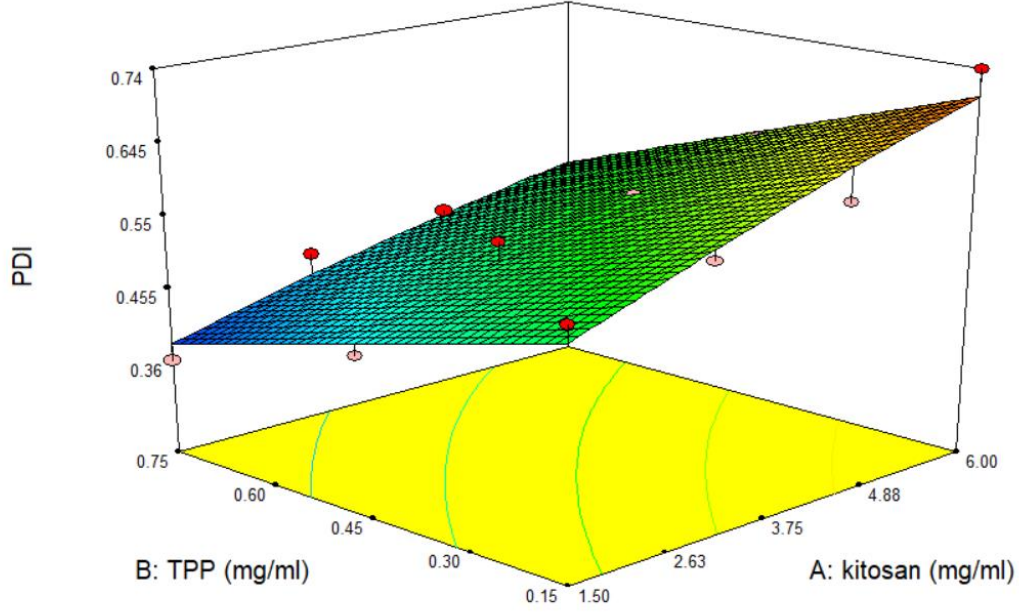
Tablo 4.10'da görüldüğü gibi, KS konsantrasyonu (p=0,0008, p<0,05) ile TPP konsantrasyonunun (p=0,0003, p<0,05) KNP'lerin PDI değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemlidir. TPP konsantrasyonu varyans analizinde görüldüğü üzere en önemli faktördür (p<0,05). KS ve TPP arasındaki ilişkinin PDI üzerine etkisi de istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur (p=0,4612, p>0,05). Modelin istatistiki anlamda önemli (p=0,0013, p<0,05) olduğu Tablo 4.10'da görülmektedir.

Yapılan deneme çalışmasının R² değeri 0,9406 bulunmuş olup, bu değer tasarımın doğru olarak kurulduğunu ve elde edilen değerlerin tasarımı desteklediğini göstermektedir. Bu deneme tasarımı sonucunda elde edilen regresyon denklemi (4.3) ise aşağıdaki gibi bulunmuştur.

PDI

$$= 0,4875 + 0,053333 * X_1 - 0,21667 * X_2 - 0,01778 * X_1 X_2 - 0,00148 * X_1^2 + 0 * X_2^2 \quad (4.3)$$

Şekil 4.7 KS ve TPP konsantrasyonunun kitosan nanopartiküllerinin PDI değerleri üzerindeki etkisini gösteren yüzey grafiğini içermektedir.



Şekil 4.7 II. deneme tasarımında kullanılan KS ve TPP konsantrasyonu (mg/mL) arasındaki ilişkinin (X_1X_2) PDI değeri üzerine olan etkisi

Şekil 4.7 incelendiğinde TPP konsantrasyonu sabit tutulup, KS konsantrasyonu artırılırsa PDI değerinin de arttığı görülmektedir. Neves ve ark. (2014) ile Hafez ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, KS/TPP oranının artmasıyla PDI değerinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir [28,34]. KS konsantrasyonu sabit tutulup, TPP konsantrasyonu artırılırsa PDI değeri azalmaktadır. Hashad ve ark. (2016) da KS konsantrasyonunun (0,1-0,3 % w/v) sabit tutulup, TPP konsantrasyonunun (0,01-0,05 % w/v) artırılmasıyla PDI değerinin arttığını belirtmiştir [88].

Sonuç olarak, KS ve TPP çözeltilerinin konsantrasyonları KNP'lerin oluşumunda en önemli etkiyi gösteren parametreler olduğu bildirilmiştir [64,101].

Yapılan denemelerden elde edilen veriler ışığında KS konsantrasyonları 3 mg/mL ile 6 mg/mL olarak seçilmiştir ve bu KS konsantrasyonları üzerine TPP'nin etkisi incelenmiştir. Belirlenen KS (3 mg/mL ile 6 mg/mL) ve TPP (0,75 mg/mL ile 0,15 mg/mL) konsantrasyonları, KNP'ler için hedeflenen düşük partikül boyutu ve PDI değerleri ile sıfırdan farklı zetapotansiyel sonuçlarını vermiştir.

Yüzey aktif madde olarak kullanılan tween 80 (T80), enkapsüle edilecek biyoaktif bileşenle (BB) karıştırılarak emülsiyonun oluşmasını sağlamaktadır. Literatüre bakıldığında, çalışmalarda yüzey aktif madde olarak kullanılan T80'in çeşitli konsantrasyonlarının kullanıldığı görülmektedir. Genel olarak kapsüllenecek BB ile aynı oranda T80 (BB/T80, 1/1) kullanıldığı [95] gibi, BB'den daha yüksek ve daha düşük oranlarda T80'in kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur [13,111,112].

Benzer şekilde BB konsantrasyonu seçimi ile ilgili yapılan literatür çalışmaları, KS/BB oranının da dikkate alınması gerektiğini göstermiştir [67,113,114]. Bu çalışmalarda genel olarak duvar materyali olan KS ile aynı oranda BB miktarı kullanılırken, duvar materyalinden daha düşük ve daha yüksek oranda BB de kullanılmaktadır. Bu çalışmada T80 konsantrasyonu ile timol (biyoaktif bileşen) konsantrasyonları 3 mg/mL ve 6 mg/mL olarak seçilmiştir. Böylece, T80'in BB ile aynı konsantrasyonundaki etkileri incelebildiği gibi, BB'den daha düşük ve daha yüksek konsantrasyonlara T80'in etkisi de gözlemlenmiştir. Ayrıca KS konsantrasyonu sabitken BB miktarının etkisi ile BB sabitken KS konsantrasyonunun etkisi de incelenmiştir.

Son olarak, iyonik jelasyon yönteminde yüzey aktif madde ile BB içeren KS çözeltisinin oda sıcaklığında ya da daha yüksek sıcaklık değerlerinde karıştırılarak teşekkül ettirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan sıcaklık dereceleri 45 °C [17,112], 50 °C [66] ve 60 °C [13,115]'dir. Fan ve ark. (2012) 45 °C'den yukarı çıkıldığında partikül boyutundaki azalışın önemsiz derece olduğunu bildirmiştir [65]. Ayrıca katı formda bulunan timolün erime sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C'dir. Bu açıdan sıcaklığın olası etkisinin incelenmesi için, oda sıcaklığı ve 45 °C sıcaklık değeri kullanılmıştır.

4.2. Timol Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin (TKNP) Eldesi İçin Deneysel Tasarım

Yapılan literatür taraması ve ön denemelerin sonucunda iyonik jelasyon yönteminde etkili olması muhtemel faktörler ve seviyeleri belirlenmiştir. Belirlenen bu faktörler ve seviyelerde elde edilen TKNP'lerin optimize edilmesi için deneysel tasarım oluşturulmuştur. Tablo 4.11'de, optimize edilecek TKNP'lerin eldesinde kullanılacak faktörler ve seviyeleri verilmiştir.

Tablo 4.11 İyonik jelasyon yöntemiyle nanopartikül eldesi için oluşturulan genel faktöriyel dizayn deneme tasarım planına göre belirlenen faktörler ve seviyeleri

Semboller	Bağımsız Değişkenler	Seviyeler	
X1	Sıcaklık (°C) (Nümerik faktör)	25	45
X2	Kitosan (mg/L) (Nümerik faktör)	3	6
X3	Timol (mg/mL) (Nümerik faktör)	3	6
X4	Tween80 (mg/L) (Nümerik faktör)	3	6
X5	TPP (mg/mL) (Nümerik faktör)	0,15	0,75

TKNP'lerin oluşturmada kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı kullanılmıştır. Sıcaklık (°C), KS (mg/mL), timol (mg/mL), T80 (mg/L) ve TPP (mg/mL)'nin belirlenen seviyelerinin nanopartiküllerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve EE (%) üzerine etkisi incelenmiş ve bu faktörler optimize edilmiştir (Tablo 4.11). İyonik jelasyon yöntemiyle nanoenkapsülasyon için belirlenen işlem aralıkları göz önünde bulundurularak 16 deneme noktalı 'Kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı' oluşturulmuştur. Yanıt verileri olarak nanokapsüller içerisine hapsedilen BB miktarının göstergesi olan EE (%), nanopartiküllerin boyutu (nm) ve zetapotansiyel (mV) değerleri incelenmiştir. Tablo 4.12'de iyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen TKNP'lerin boyut (nm), zetapotansiyel (mV) ve EE (%) değerleri oluşturulan faktöriyel dizayn deneme tasarımında verilmiştir.

Tablo 4.12 İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin boyut zetapotansiyel ve enkapsülasyon etkinlik değerlerinin oluşturulan faktöriyel dizayn deneme tasarımında gösterimi

DN	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Boyut (nm)	ZP (mv)	EE (%)
1	25	3	3	3	0,75	368	31,4	30,5
2	25	3	3	6	0,15	344	13,2	1
3	25	3	6	3	0,15	441	39,8	48,2
4	25	3	6	6	0,75	486	21,9	60,2
5	25	6	3	3	0,15	276	42	21
6	25	6	3	6	0,75	878	24,4	3,1
7	25	6	6	3	0,75	585	42,5	48,1
8	25	6	6	6	0,15	419	32,8	48,8
9	45	3	3	3	0,15	323	35,9	22,8
10	45	3	3	6	0,75	486	13,7	30,9
11	45	3	6	3	0,75	354	35,5	66,4
12	45	3	6	6	0,15	396	31,5	56,7
13	45	6	3	3	0,75	606	37,7	35,4
14	45	6	3	6	0,15	582	30,7	9,3
15	45	6	6	3	0,15	496	37,9	52,6
16	45	6	6	6	0,75	1034	30,7	54,1

X₁ (Sıcaklık, °C), X₂ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₃ (Timol konsantrasyonu, mg/mL), X₄ (Tween 80 konsantrasyonu, mg/mL), X₅ (TPP konsantrasyonu, mg/mL); DN: Deneme noktaları
ZP: Zetapotansiyel EE: Enkapsülasyon etkinliği

Tablo 4.12 incelendiğinde görüldüğü gibi, yapılan deneme tasarımında belirtilen değerlerde partikül boyutu 276–1034 nm, zetapotansiyel 13,2–42,5 mV ve EE % 1–66,4 arasında bulunmuştur.

4.2.1 Nanoenkapsülasyon Parametrelerinin Enkapsülasyon Etkinliği (%) Üzerine Etkisi

Enkapsülasyon etkinliği, muhtemelen enkapsülasyon sürecinin başarılı olarak kabul edilmesi için en önemli kriterdir. EE, çekirdek materyalin duvar içerisinde ne kadarının kapsüllendiğini veya tutulduğunu gösterir.

Tablo 4.13'te EE sonuçlarına ait ANOVA tablosu verilmiştir. ANOVA analizinde, istatistiksel olarak önemsiz parametreler arasındaki etkileşimler ortadan kaldırılarak basit bir regresyon modeli elde edilmiştir.

Tablo 4.13 Enkapsülasyon etkinliği (%) sonuçlarına göre ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	6331,174	904,4535	53,67278	< 0,0001
X1	283,0806	283,0806	16,79879	0,0034
X2	122,6556	122,6556	7,278726	0,0272
X3	4938,576	4938,576	293,0688	< 0,0001
X4	231,8006	231,8006	13,75569	0,0060
X5	291,5556	291,5556	17,30172	0,0032
X2 X5	158,1306	158,1306	9,383911	0,0155
X3 X4	305,3756	305,3756	18,12184	0,0028
Kalıntı	134,81	16,85125		
Düzeltilme Toplamı	6465,984			
R²=0,9792; Düzeltilmiş R²= 0,9609				

X₁ (Sıcaklık, °C), X₂ (Kitosan konsantrasyonu, g), X₃ (Timol konsantrasyonu, mg/mL), X₄ (Tween 80 konsantrasyonu, mg/mL), X₅ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p< 0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir

Tablo 4.13 incelendiğinde TKNP eldesinde EE (%) sonuçları için oluşturulan modelin istatistiksel anlamda önemli (p<0,05) olduğu görülmektedir. Ayrıca sıcaklık derecesi (p<0,05), KS konsantrasyonu (p<0,05), timol konsantrasyonu (p>0,05), T80 konsantrasyonu (p<0,05) ve TPP konsantrasyonu (p<0,05) da oluşturulan nanopartiküllerin EE (%) üzerine etkisi istatistiksel anlamda önemlidir. Etkisi incelenen bağımsız parametrelerin hepsinin, TKNP'lerin EE (%)'si üzerine istatistiksel anlamda önemli etki ettiği görülmüştür.

Bu bağımsız parametreler içerisinde en önemli etkiyi timol konsantrasyonu ($p < 0,0001$) göstermiştir. Bu durum diğer parametrelere bağlı olarak timol konsantrasyonun 3 mg/mL'den 6 mg/mL'ye çıkartılması EE'de büyük bir artışa neden olmuştur ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bununla birlikte KS konsantrasyonu (X_2) ile TPP konsantrasyonu (X_5) arasındaki ilişkinin (X_2X_5) EE'ye etkisi ile timol (X_3) ve T80 konsantrasyonları (X_4) arasındaki ilişkinin (X_3X_4) EE'ye etkisi de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

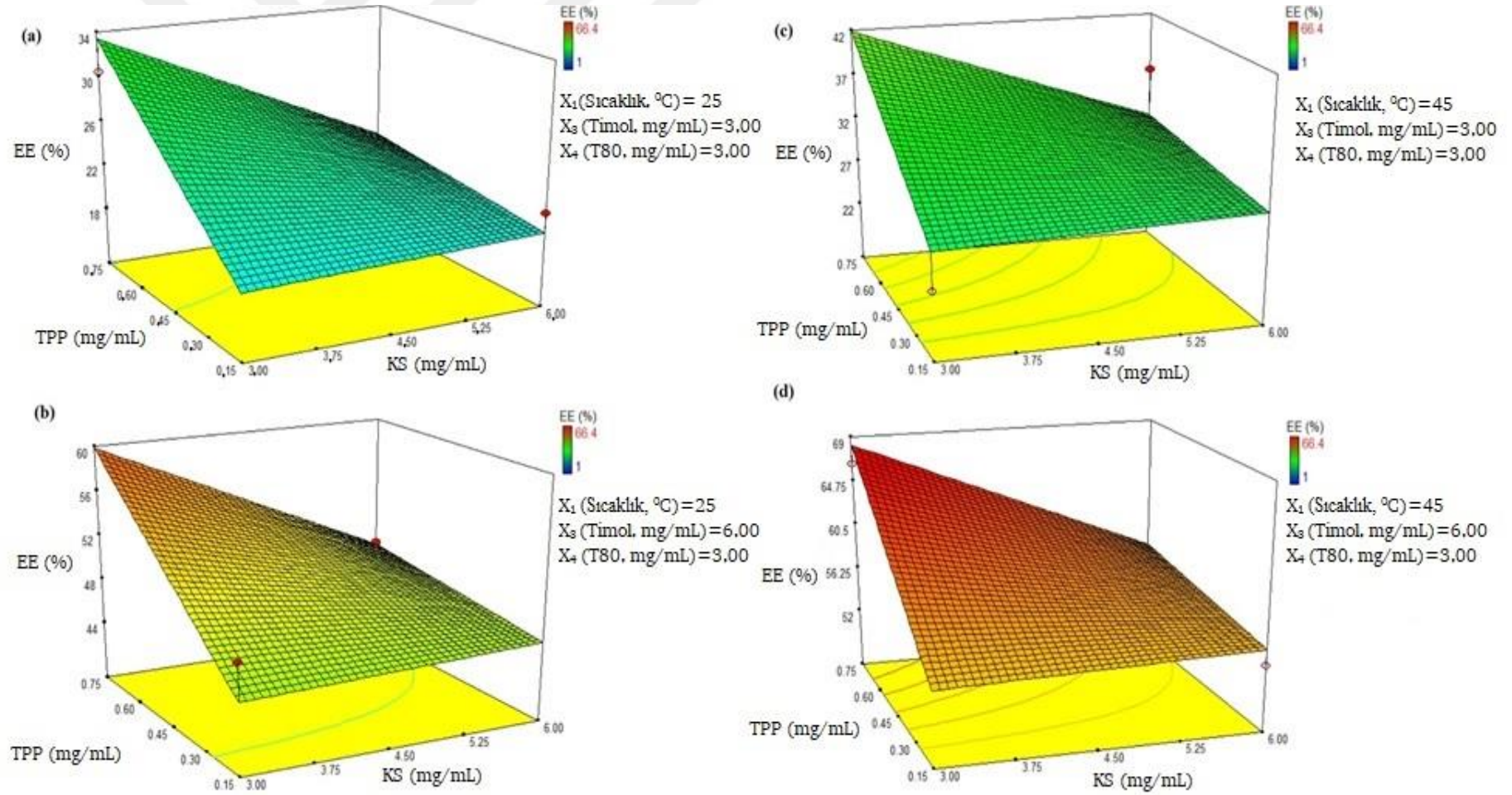
Düzeltilmiş- R^2 değerleri, modeldeki istatistiksel olarak önemsiz terimlerin ortadan kaldırılmasından sonra elde edilen değerlerdir. Oluşturulan faktöriyel dizayn deneme tasarımının, EE sonuçları için düzeltilmiş- R^2 değeri 0,9609'dur. Yanıtlar için R^2 değeri (0,9792) ise 1'e oldukça yakındır, bu da bağımsız parametreler ve yanıtlar arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Yüksek R^2 değeri, tahmin edilen ve deneysel değerlerin afinitesini belirten bir model için başarı olarak yorumlanabilir [116].

Regresyon denklemi, uygun iki faktörlü etkileşimler ve istatistiksel olarak önemsiz değerlerin çıkarılmasıyla oluşturulmuştur. EE için regresyon denklemi (4.4) aşağıdaki gibi bulunmuştur.

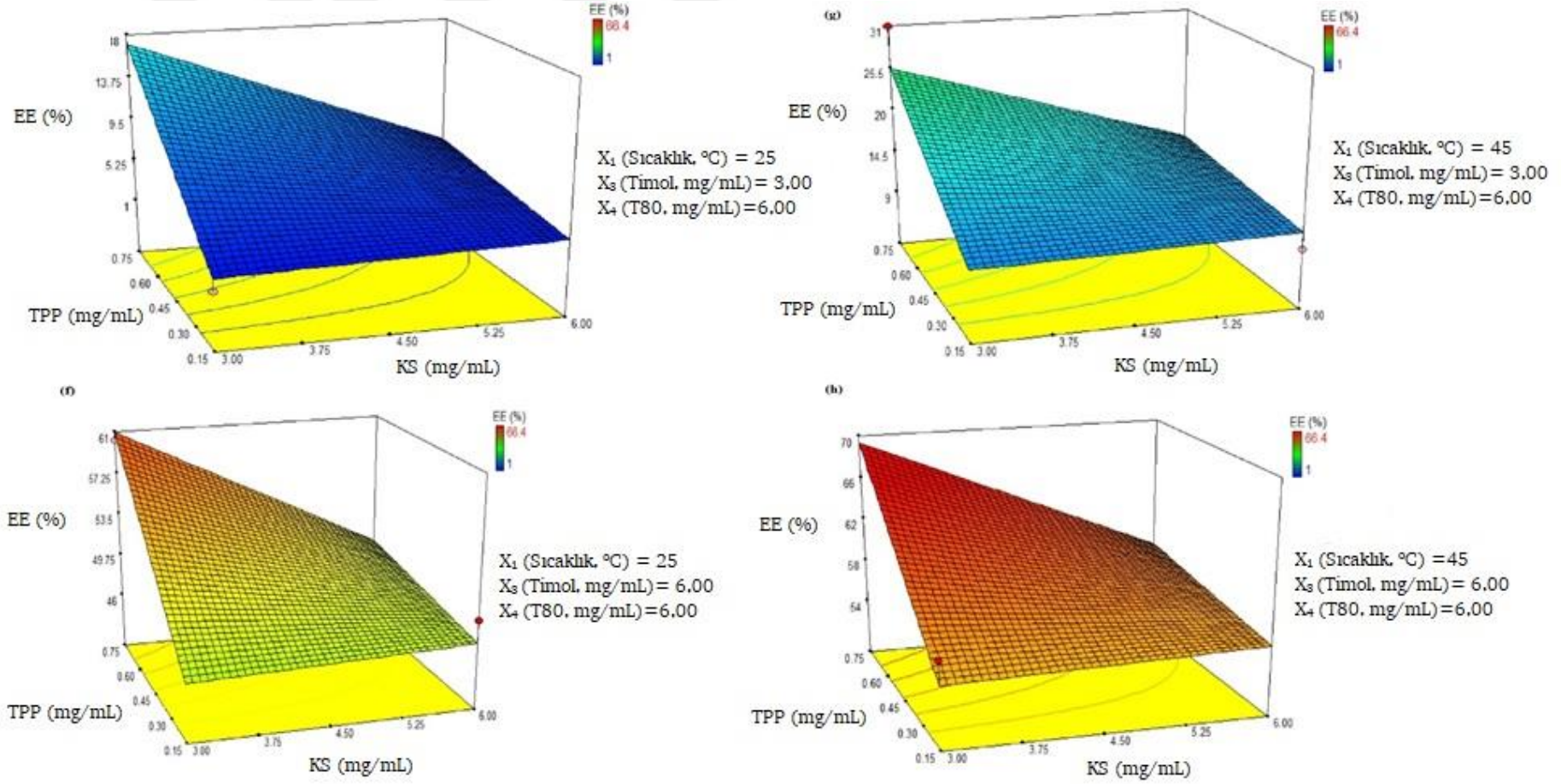
Enkapsülasyon Etkinliği =

$$7,884375 + 0,420625 * X_1 + 1,297917 * X_2 + 2,975 * X_3 - 11,275 * X_4 + 45,66667 * X_5 - 6,98611 * X_2X_5 + 1,941667 * X_3X_4 \quad (4.4)$$

Şekil 4.8'de, KS ve TPP (X_2X_5) konsantrasyonları arasındaki etkileşim gösterilmektedir.



Şekil 4.8 EE için KS (X_2) ve TPP (X_5) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi



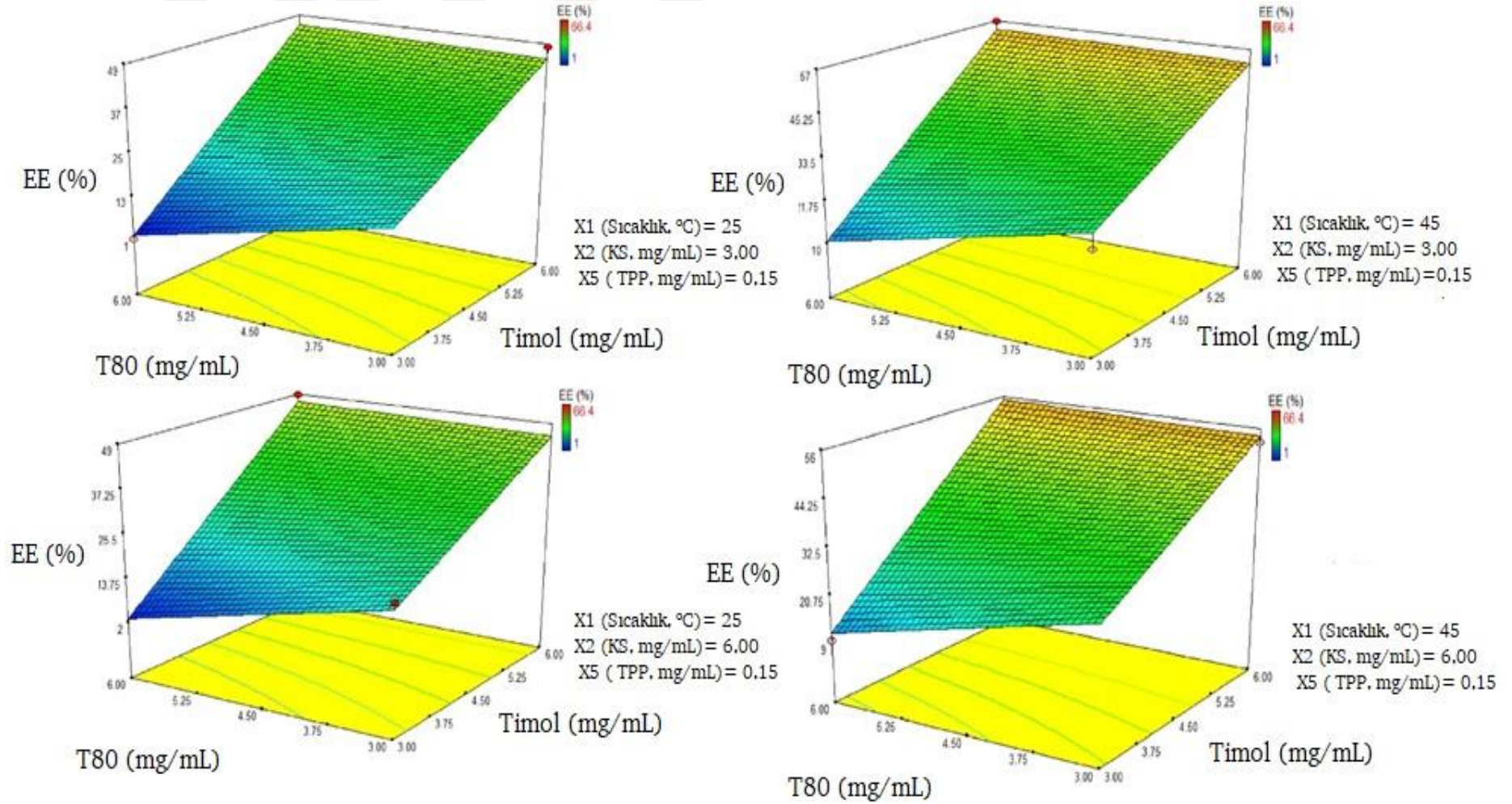
Şekil 4.8 EE için KS (X_2) ve TPP (X_5) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi (devamı)

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, KS konsantrasyonunun artırılması ile EE azalmaktadır. TPP konsantrasyonunun artması ise EE'de artışa neden olmuştur. Ayrıca timol konsantrasyonunun 3 mg/mL' den 6 mg/mL 'ye arttırılması ile daha yüksek EE elde edilmektedir. Aynı şartlar altında sıcaklığın artması EE'yi daha da artırmıştır. Timol konsantrasyonu ve sıcaklık sabit tutulduğunda, T80 konsantrasyonunun artırılması ise EE'de azalmaya neden olmuştur.

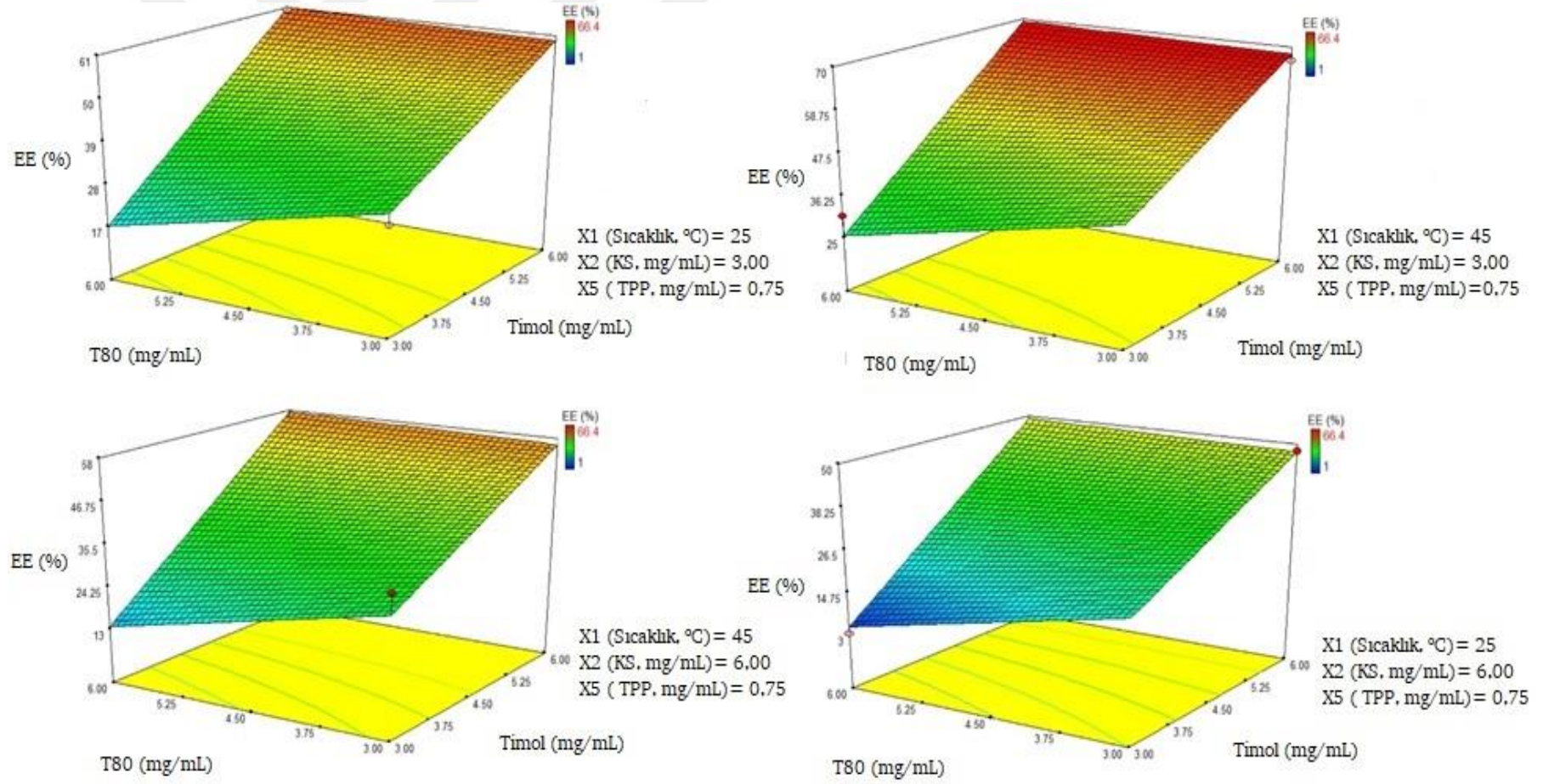
T80 konsantrasyonunun artmasının TKNP'lerin santrifüjü sırasında çöken partikül miktarında büyük bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. EE spektrofotometrik yöntemde TKNP'ler santrifüj edilerek çöken partiküller miktarı üzerinden hesaplanmaktadır. Düşük KS konsantrasyonunda (3 mg/mL) kullanılan yüksek T80 konsantrasyonu (6 mg/mL), nanopartiküllerin santrifüjü sırasında çöken partikül miktarını oldukça azalttığı için EE de düşük çıkmış olabilir.

Çekirdek malzeme miktarının artması EE'yi artırmaktadır. Ancak duvar malzemesinin taşıyabileceğinden daha fazla çekirdek malzeme eklenmesi durumunda ise EE'nin olumsuz etkilendiği bilinmektedir [13,66]. Bu çalışmada, çekirdek konsantrasyonunun duvar materyalinin taşıyabileceği düzeyde olduğu görülmüştür. TPP konsantrasyonu 0,15 mg/mL olduğunda EE'nin düşük olmasının nedeni bu TPP konsantrasyonunun nanopartikül oluşumu için çapraz bağlamadaki yetersizliğinden kaynaklanabilir [111]. TPP, sulu asetik asit (%1'lik) ile çözündürülen KS'nin pozitif amino gruplarıyla etkileşime giren beş negatif yük grubuna sahiptir. TPP konsantrasyonunun 0,75 mg/mL olması KS molekülleriyle yüksek derecede çapraz bağlanmaya neden olarak daha kompakt partikül yapıları oluşturmuş olabilir [117].

Şekil 4.9'da Timol ile T80 konsantrasyon (X3X4) parametreleri arasındaki etkileşim gösterilmektedir.



Şekil 4.9 EE için timol (X3) ve T80 (X4) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi



Şekil 4.9 EE için timol (X3) ve T80 (X4) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi(devamı)

Şekil 4.9 incelendiğinde görüldüğü gibi, timol konsantrasyonunun artması EE'yi artırırken, T80 konsantrasyonunun artması ise EE'yi azaltmaktadır. TPP konsantrasyonunun 0,15 mg/mL olduğu koşullar altında KS konsantrasyonunun arttırılması EE'de önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. TPP konsantrasyonu 0,75 mg/mL olduğunda ise KS konsantrasyonunu arttırılması EE'yi daha fazla etkilemiştir. TPP konsantrasyonu 0,75 mg/mL olduğunda, KS konsantrasyonundaki artış boyutun artmasına da neden olmuştur. Bu durum çarpaz bağlamanın yeterli düzeyde olmaması ile daha viskoz ve jel yapının oluşmasına bağlanabilir. Böyle bir durum, timolün kapsüllenmesini de etkilemiş ve EE'de azalmaya neden olmuş olabilir. Şekiller (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) genel olarak incelendiğinde, nanoenkapsülasyon işlemi sırasında artan sıcaklığın EE'yi arttırma eğiliminde olduğu görülmüştür. Hosseini ve ark. (2013) KNP'ler içerisinde kekik esansiyel yağını enkapsüle ettiği çalışmada, homojen bir karışım elde etmek için 45 °C'de 2 saat karıştırma işlemi uygulanmış ve EE (%) $24,72 \pm 4,39$ olarak bulunmuştur [112]. Bununla birlikte, yapılan literatür taramasında iyonik jelasyon sırasında uygulanan sıcaklığın EE üzerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada timol iki aşamalı bir süreçle enkapsüle edilmiştir. Bu aşamalar sırasıyla su içinde yağ (y/s) emülsifikasyonu ve iyonik jelasyondur. Sıcaklık katı haldeki timolün erimesine ve T80 ile homojen bir şekilde karışmasına neden olmuş olabilir. Su içinde yağ (y/s) emülsifikasyonu sürecinin başarılı olması çapraz bağlayıcı ajanla emülsiyonun etkileşimini arttırmış ve böylece EE'de artışa neden olmuş olabilir. Timol konsantrasyonunun arttırılması tüm koşullar altında EE'de artışa yol açmıştır. Yüksek KS konsantrasyonu kullanıldığında T80 konsantrasyonun arttırılması (sabit timol konsantrasyonunda) EE'de kısmi bir artışa neden olmuştur. KS konsantrasyonu düşük tutulduğunda ise, T80 oranının arttırılması EE'yi azaltma eğilimindedir. Benzer şekilde, KS konsantrasyonu düşük tutulduğunda TPP konsantrasyonu arttırılırsa EE'de önemli bir artış gözlemlenirken, KS konsantrasyonu yüksek tutulduğunda ise EE'de kısmi bir artış gözlemlenmiştir.

Özet olarak, TPP konsantrasyonunun arttırılıp, KS ve T80'nin düşük konsantrasyonda tutulması EE'yi arttırmaktadır. Başka bir ifadeyle, yüksek bir timol konsantrasyonu, düşük KS ve T80 konsantrasyonları kullanıldığında, TPP konsantrasyonunun arttırılması EE'nin artmasına önemli bir katkıda bulunmuştur.

4.2.2 Nanoenkapsülasyon Parametrelerinin Partikül Boyutu (nm) Üzerine Etkisi

Bu deneysel tasarımda, ortalama partikül büyüklüğüne göre optimizasyonun gerçekleştirilmesi için veriler faktöriyel modele yüklenmiş ve Tablo 4.14'te gösterildiği gibi ANOVA ile analiz edilmiştir.

Tablo 4.14 Boyut (nm) sonuçlarına göre ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	597474,5	74684,31	24,59581	0,0002
X1	14400	14400	4,742358	0,0659
X2	175980,3	175980,3	57,95565	0,0001
X4	86436	86436	28,466	0,0011
X5	144400	144400	47,55531	0,0002
X1 X2	25600	25600	8,430858	0,0229
X2 X4	32761	32761	10,78919	0,0134
X2 X5	81225	81225	26,74986	0,0013
X4 X5	36672,25	36672,25	12,07729	0,0103
Kalıntı	21255,25	3036,464		
Düzeltilme Toplamı	618729,8			
R²=0,9656; Düzeltilmiş R²=0,9264				

X₁ (Sıcaklık, °C), X₂ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₄ (Tween 80 miktarı, mg/mL), X₅ (TPP konsantrasyonu, mg/mL), p<0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir,

Tablo 4.14 incelendiğinde, TKNP'lerin eldesinde boyut (nm) sonuçları için oluşturulan modelin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (p<0,05).

Ayrıca KS konsantrasyonunun (p<0,05), T80 konsantrasyonunun (p<0,05) ve TPP konsantrasyonunun (p<0,05) oluşturulan nanopartiküllerin boyutu (nm) üzerine ayrı ayrı etkisinin de istatistiksel anlamda önemli olduğu tespit edilmiştir.

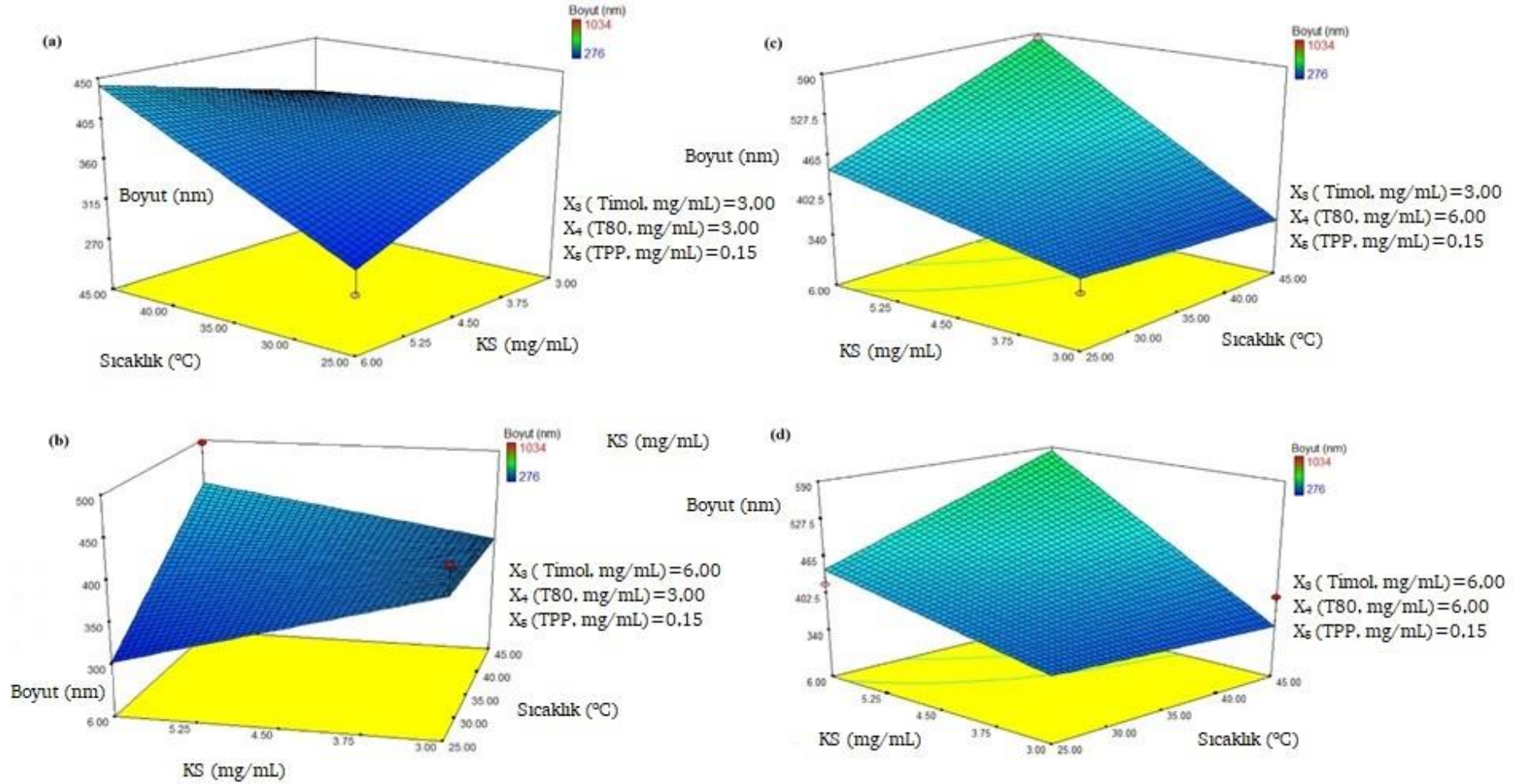
Etkisi incelen bağımsız parametreler içerisinde nanopartiküllerin boyutu üzerine en büyük etkiyi KS ve TPP konsantrasyonu yapmıştır ($p < 0,0001$). Antoniou ve ark. (2015) yaptığı çalışma ile KNP'lerin partikül büyüklüğünün ve zetapotansiyelinin, KS'nın moleküler ağırlığı, KS ve TPP konsantrasyonu ile reaksiyonun pH'sına yüksek oranda bağlı olduğunu bildirmiştir [118]. Ayrıca, birçok çalışmada boyutun önemi vurgulanmış ve nanopartiküllerin mikrokürelere göre avantajları açıklanmıştır [65]. Tablo 4.14'teki varyans analizi sonucunda KS, T80 ve TPP konsantrasyonlarının TKNP'lerin partikül boyutu üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, sıcaklık derecesi ($p > 0,05$) ve timol konsantrasyonunun etkileri ($p > 0,05$) istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Deneme tasarımında 3 ve 6 mg/mL seviyesinde kullanılan timol konsantrasyonu ile sıcaklığın 25 °C' den 45 °C' ye çıkarılması nanoenkapsülasyon işleminde partikül boyutu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Sıcaklığın boyut üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diğer parametrelerle olan etkileşimleri dikkate alınarak regresyon denklemine eklenmiştir. Sıcaklık parametresi için p değerinin istatistiksel olarak önemli sınıra çok yakın olması nedeniyle modelin R^2 değeri üzerinde nispi etkisi olacağı düşünüldüğünden regresyon denklemi bu şekilde düzenlenmiştir. Bu koşullar altında düzeltilmiş R^2 değeri, bağımsız parametreler ve yanıtlar arasında güçlü bir korelasyon gösteren 0,9264 olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra sıcaklık derecesi (X_1) ile KS konsantrasyonu (X_2) arasındaki etkileşim (X_1X_2), KS konsantrasyonu (X_2) ile T80 konsantrasyonu (X_4) arasındaki etkileşim (X_2X_4), KS konsantrasyonu (X_2) ile TPP konsantrasyonu (X_5) arasındaki etkileşim (X_2X_5) ve T80 konsantrasyonu (X_4) ile TPP konsantrasyonu (X_5) arasındaki etkileşim (X_4X_5) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Regresyon denklemi, partikül büyüklüğü için uygun iki faktörlü etkileşimler ve istatistiksel olarak önemsiz değerlerin çıkarılmasıyla oluşturulmuştur.

Partikül büyüklüğü için regresyon denklemi (4.5) aşağıdaki gibi bulunmuştur.

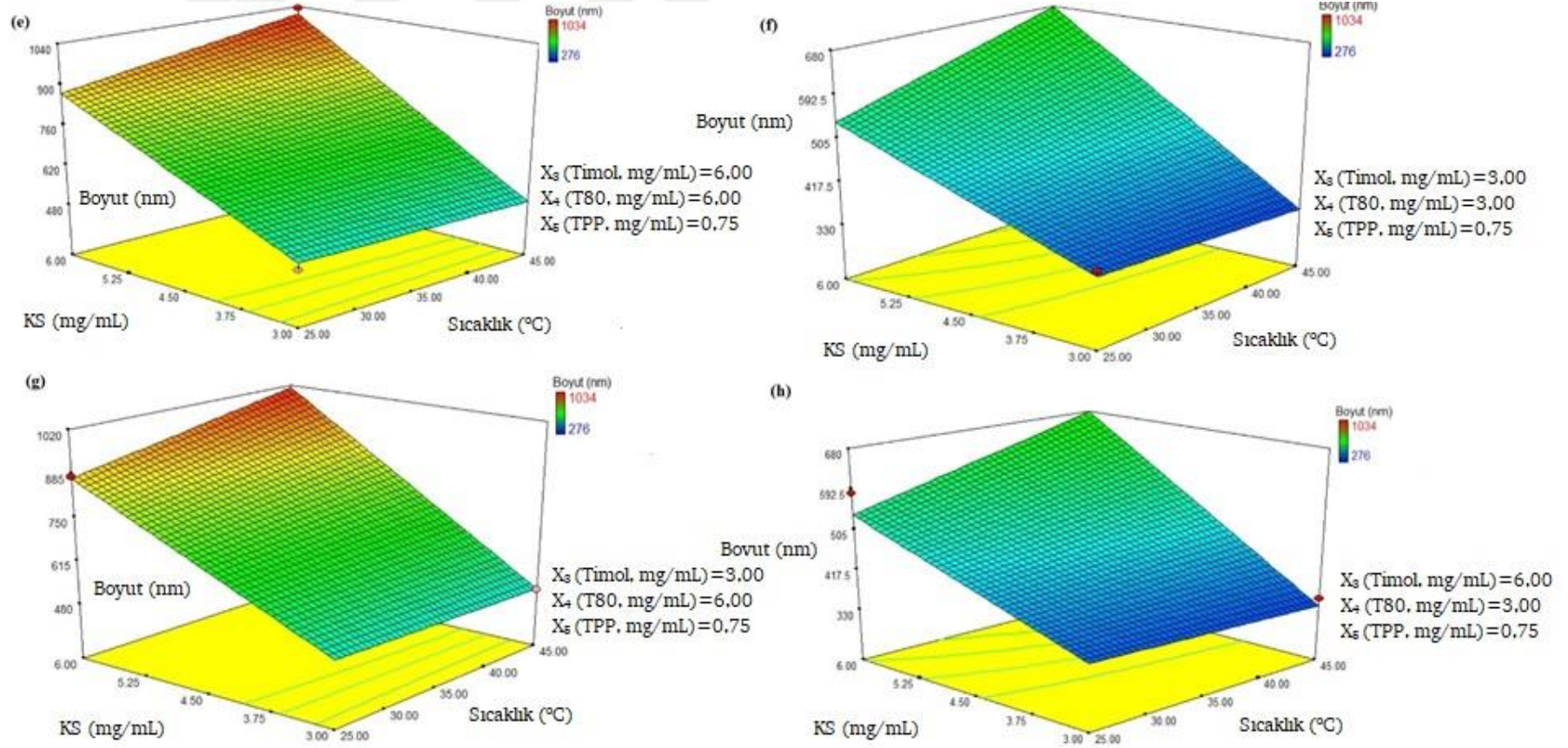
Boyut

$$\begin{aligned} &= 1085,313 - 9 * X_1 - 185,167 * X_2 - 89,375 * \\ &X_4 - 874,583 * X_5 + 2,666667 * X_1X_2 + 20,11111 \\ &* X_2X_4 + 158,3333 * X_2X_5 + 106,3889 * X_4X_5 \end{aligned} \quad (4.5)$$

Şekil 4.10'da T80 ve TPP parametrelerine bağlı olarak ANOVA analizinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan sıcaklık derecesi ve KS konsantrasyonu arasındaki etkileşim (X1X2) gösterilmektedir.



Şekil 4.10 Boyut için, sıcaklık derecesi (X_1) ve KS (X_2) konsantrasyonu arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi



Şekil 4 10 Boyut için, sıcaklık derecesi (X_1) ve KS (X_2) konsantrasyonu arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi (devamı)

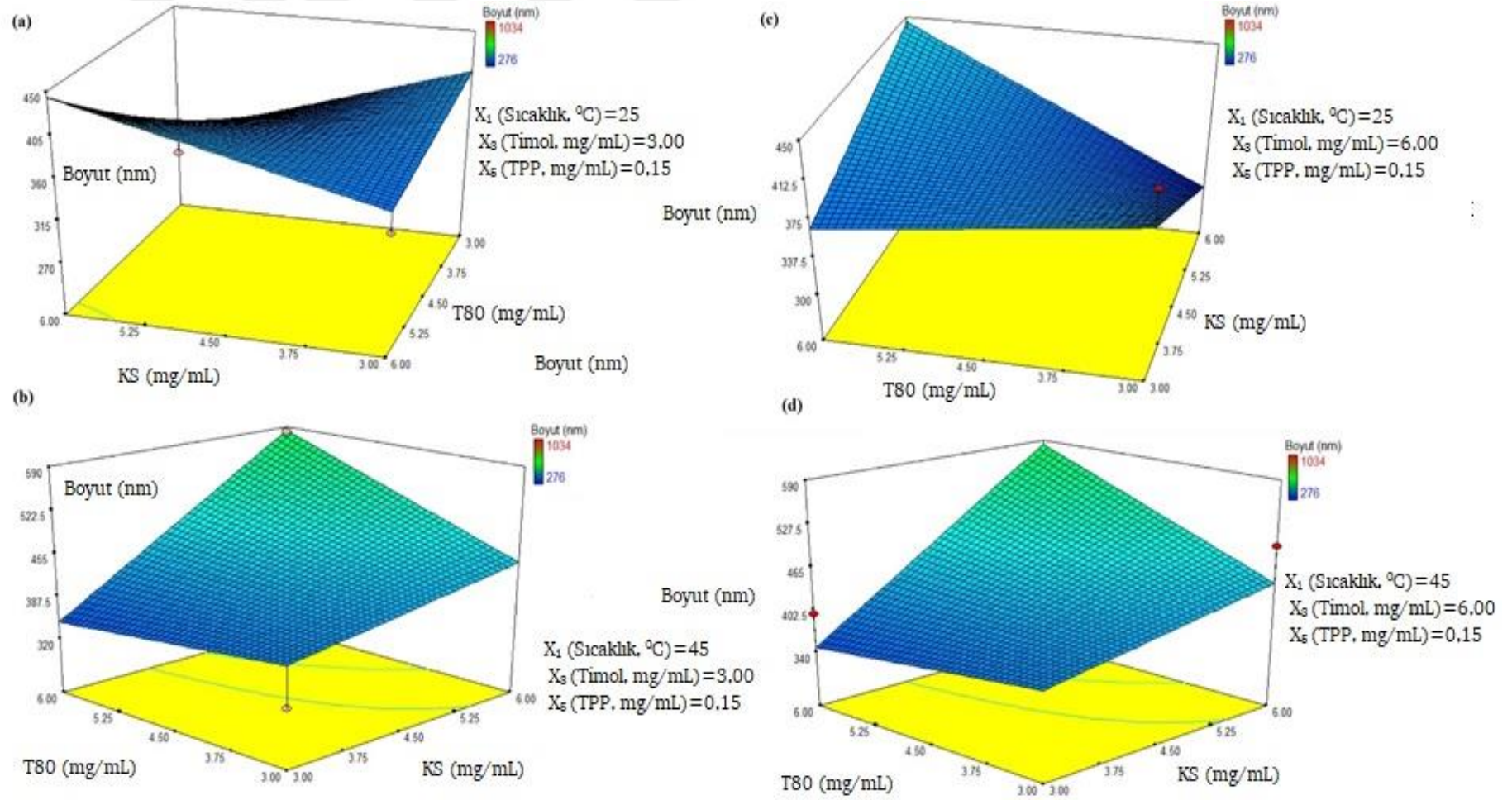
T80 ve TPP konsantrasyonu sabit tutulduğunda ve KS konsantrasyonu 3 mg/mL olduğunda sıcaklığın artması partikül boyutunda kısmi bir azalışa neden olurken, KS konsantrasyonun 6 mg/mL'ye çıkarılması ile sıcaklıktaki artış partikül boyutunda artışa neden olmaktadır. Bununla birlikte, sıcaklık derecesinin değişmesiyle partikül boyutunda meydana gelen bu artış ya da azalış, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Şekil 4.10 incelendiğinde T80 konsantrasyonunun arttırılmasının, sabit TPP konsantrasyonlarında (0,75 veya 0,15 mg/mL) partikül boyutunu arttırdığı görülmüştür. Chuacharoen ve ark. (2019) orta zincirli trigliserit (MCT), T80 ve lesitin karışımını kurkumin yüklü nanoemülsiyon oluşumunda kullanmıştır. Yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, hazırlanan nanoemülsiyon karışımında T80 konsantrasyonunun artması ortalama partikül büyüklüğünde artışa neden olmuştur [119]. Bu artışın sebebi, amfifilik molekül olarak görev yapan T80'in partikül yüzeyinde birikmesi olabilir. Bu nanopartiküllerde zetapotansiyel değerlerinin sıfıra yakın olduğu bildirilmiştir. Bir başka ifadeyle, aşırı miktardaki noniyonik yüzey aktif madde partiküllerin yüzeyini etkilemiş ve bu durum partiküllerin kümeleşmesine neden olmuş olabilir. T80 konsantrasyonun yüksek seviyelere çıkması durumunda partikül boyutunda artma olmasının nedenlerinden biri, hidrofilik gruplarının (baş kısmı) sayısının artması ile daha büyük emülsiyon damlacıklarının oluşması olabilir. Nanopartikül boyutunun artmasının bir başka nedeni ise, yüksek emülsifiyer konsantrasyonunun dış fazın viskozitesinde artışa ve bunun da kümelenmiş damlacıkların oluşmasına yol açması olarak düşünülebilir. Bu yüksek viskozite, emülsiyondaki kesme kuvvetlerine karşı dirence, daha az verimli karıştırmaya ve böylece nanopartiküllerin boyutu üzerinde olumsuz bir etki yol açabilir [120].

Ostwald olgunlaşması, nanoemülsiyonların destabilizasyonuna neden olan temel mekanizmalardan biridir [121]. Bu mekanizma çok sayıda küçük partikülün çözünmesi ve büyük partiküllerin çözünen partikülden monomer adı verilen birim yapıların meydana gelmesiyle oluşur [122]. Karıştırma sırasında Ostwald olgunlaşması meydana gelirse, daha büyük partiküllerin oluşabilir. Bu nedenle T80 oranı 3 veya 6 mg/mL'ye sabitlendiğinde, artan TPP veya KS konsantrasyonları partikül boyutunu artırma eğilimi göstermiştir.

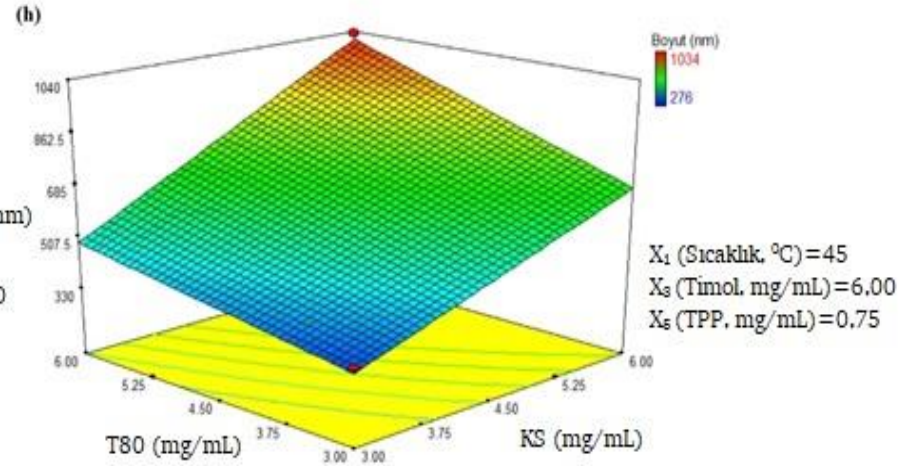
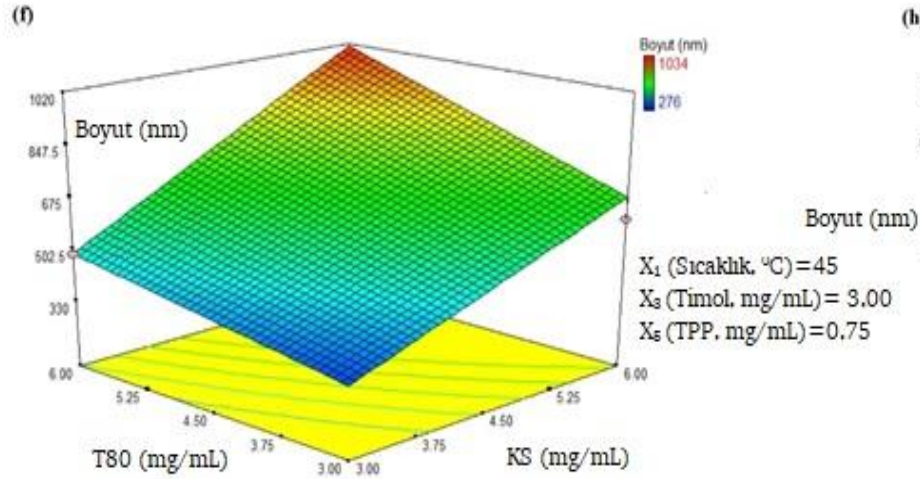
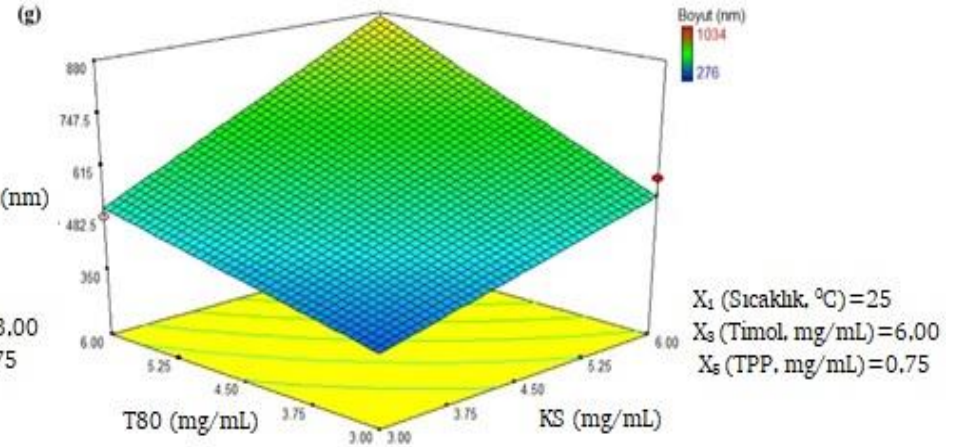
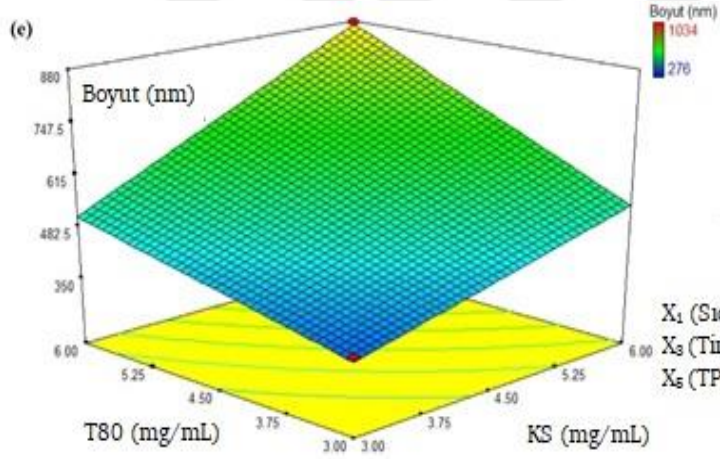
Benzer şekilde T80 gibi, aşırı miktarda çapraz bağlayıcı ajan kullanılması (TPP) da partiküllerin kümeleşmesine yol açarak daha büyük partikül boyutu oluşturmaktadır [65].

Şekil 4.11’de T80 ile KS konsantrasyonları arasındaki etkileşim (X2X4) gösterilmektedir ve bu etkileşim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.





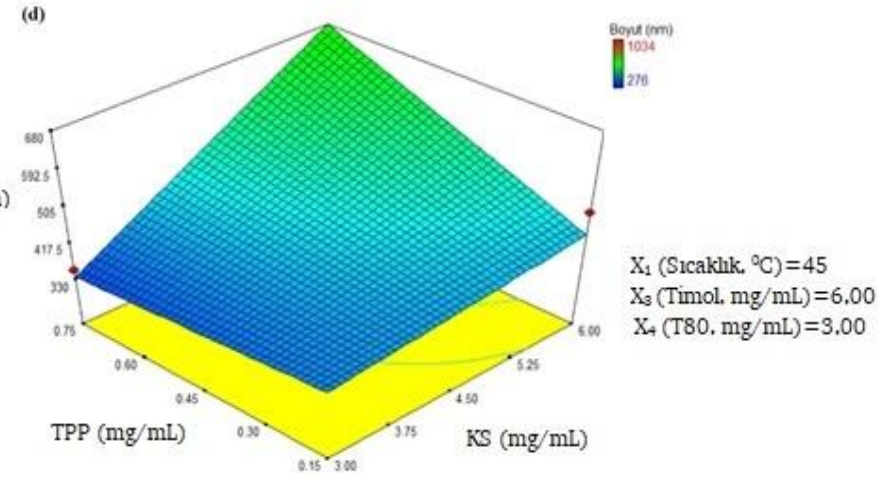
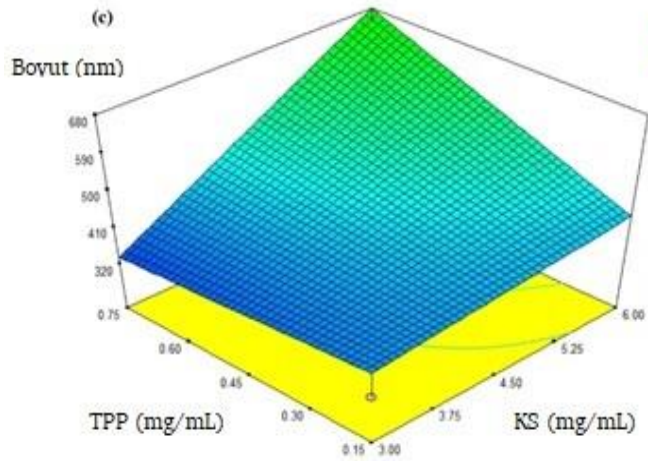
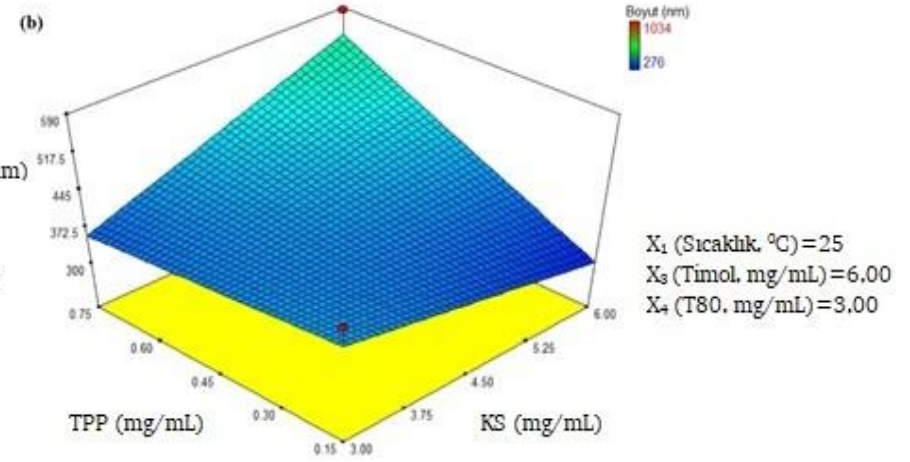
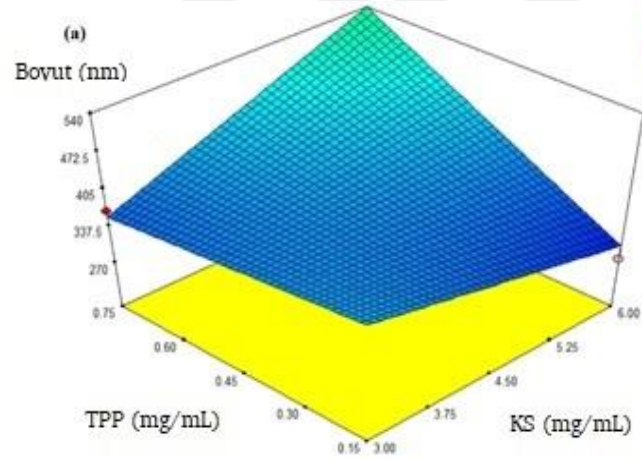
Şekil 4.11 Boyut için KS (X_2) ve T80 (X_4) arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi



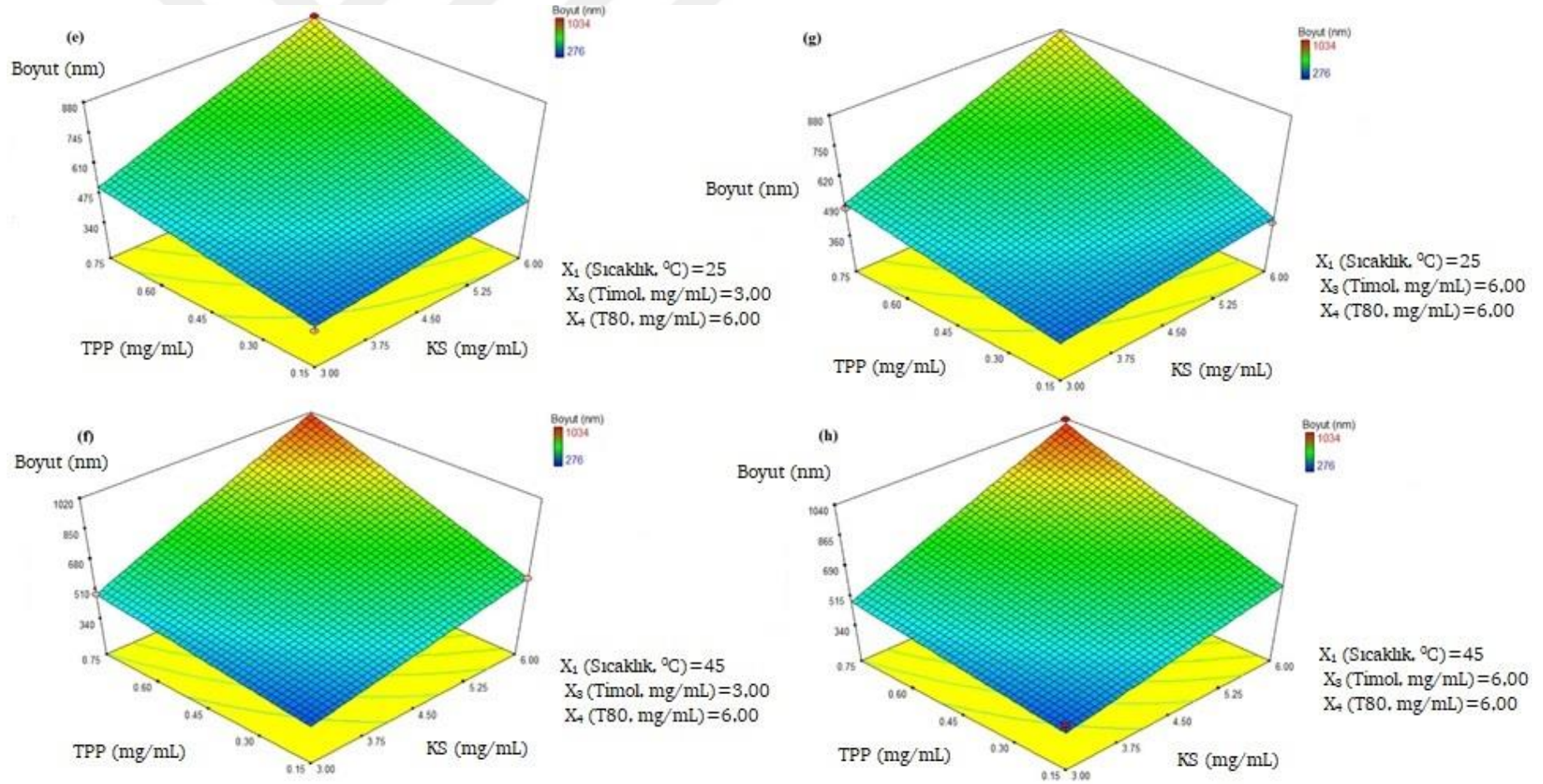
Şekil 4.11 Boyut için KS (X_2) ve T80 (X_4) arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi(devamı)

Şekil 4.11 incelendiğinde eş zamanlı sıcaklık, KS ve T80 konsantrasyonlarının (TPP sabitken) artışı partikül boyutunda kısmi bir artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, KS ve T80 konsantrasyonlarına bağlı olarak TPP'deki artış partikül boyutunda artışa neden olmuştur. T80 konsantrasyonunun artırılması, TPP (0,15 mg/mL) ve KS (3 mg/mL) konsantrasyonlarının düşük olduğu seviyelerde boyut üzerine fazla bir etki göstermezken, bunun dışındaki TPP ve KS konsantrasyonlarında T80'nin artırılması boyutta artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda KS ve T80 ile yüksek konsantrasyonlarda TPP (timol sabitken) kullanılması, daha düşük partikül boyutunun oluşmasına neden olmuştur.

Şekil 4.12'de istatistiksel olarak anlamlı bulunan TPP ve KS konsantrasyonları arasındaki etkileşim (X2X5) gösterilmektedir.



Şekil 4.12 Boyut için; KS (X_2) ve TPP (X_5) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi

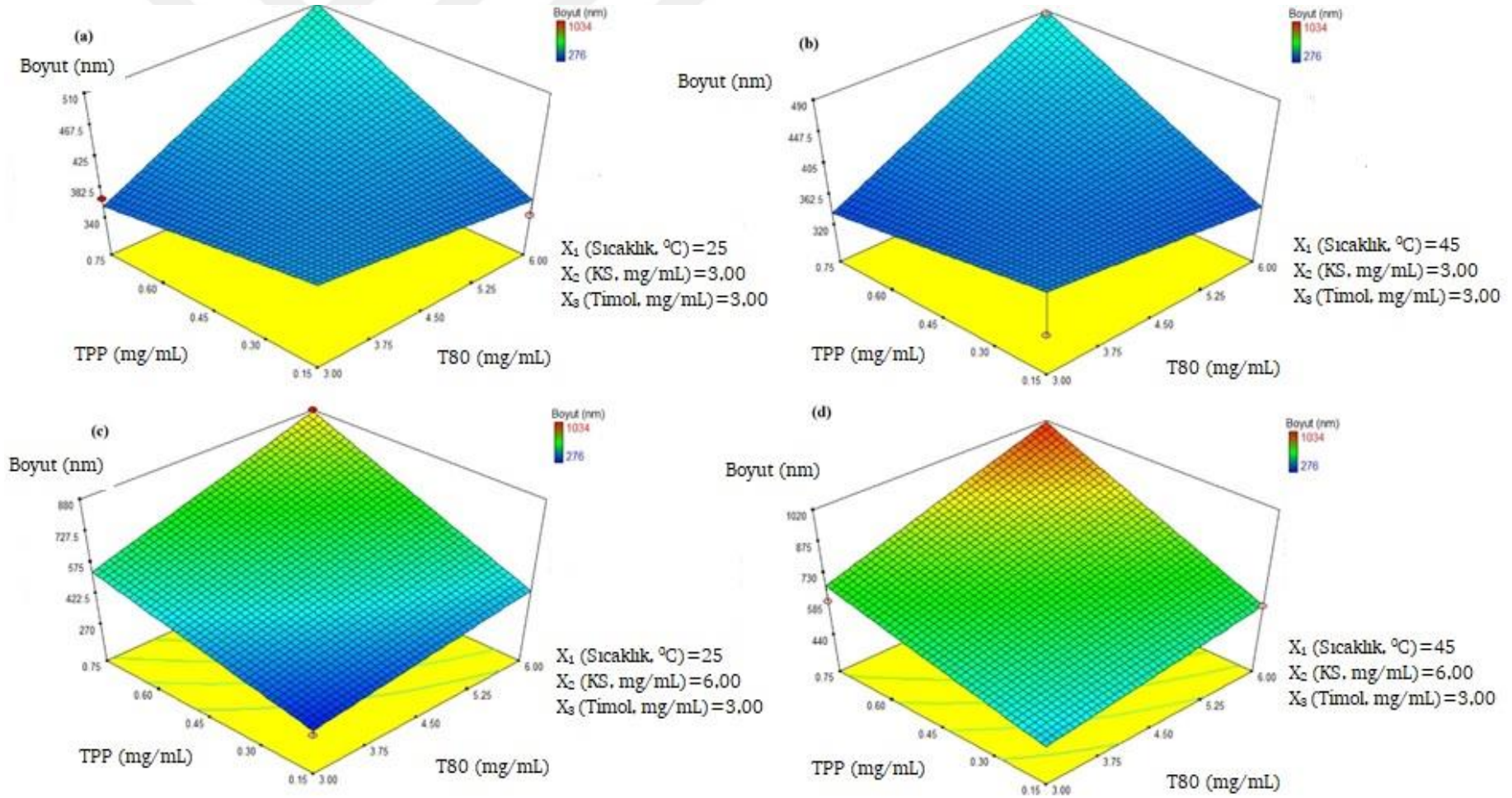


Şekil 4.12 Boyut için; KS (X_2) ve TPP (X_5) konsantrasyonları arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi(devamı)

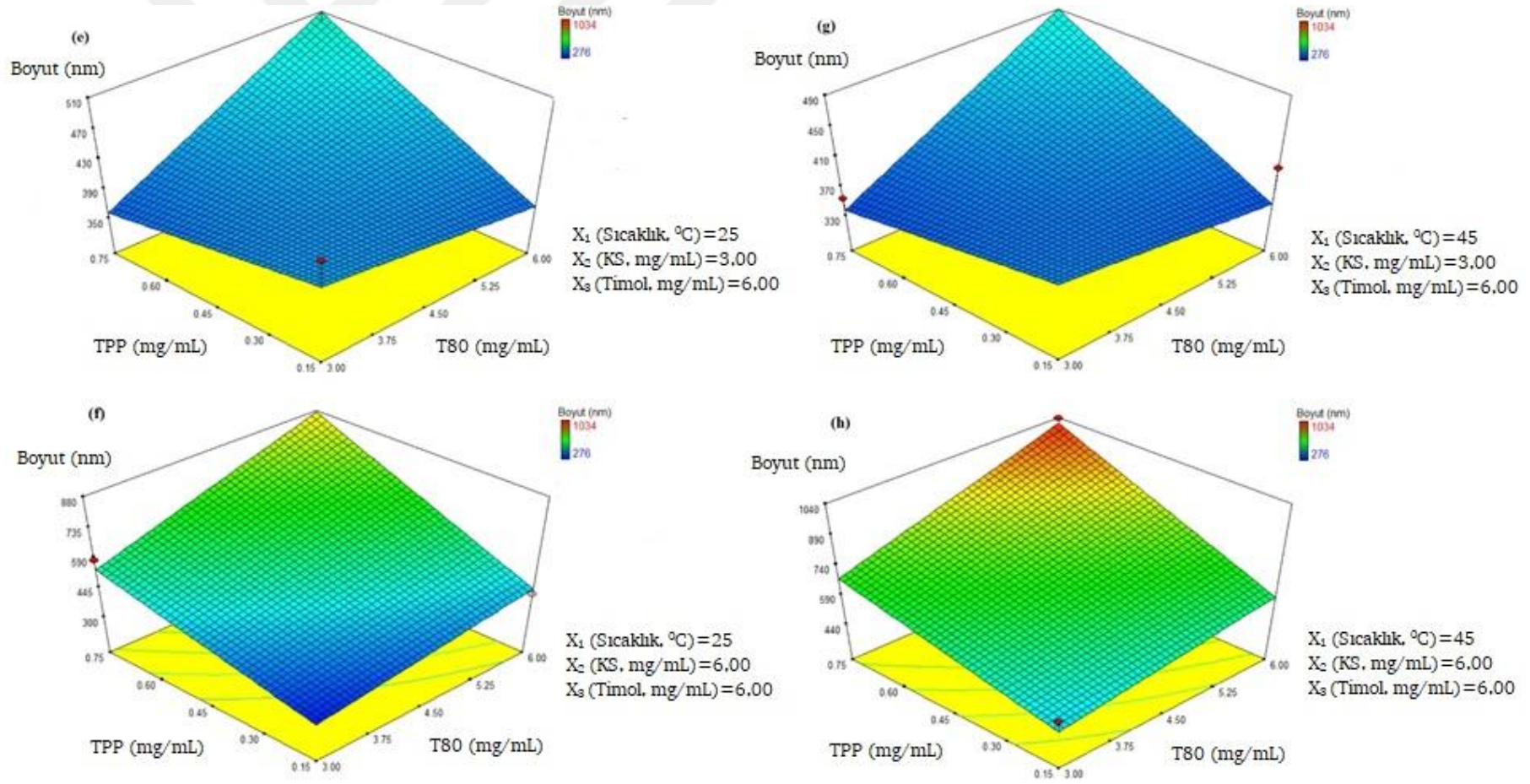
Şekil 4.12 incelendiğinde KS ve TPP konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak sıcaklık artışı (T80 sabitken) partikül boyutunda kısmi bir artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, KS ve TPP konsantrasyonlarına (sıcaklık sabitken) bağlı olarak T80 konsantrasyonunun arttırılması da partikül boyutunda artış sağlamıştır. KNP'lerin üretildiği bir çalışmada sıcaklıktaki artışın (35°C 'den-65°C 'e) KS moleküllerinin hidrate suyunu azalttığı ve KS zinciri esnekliğinde bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda KS moleküllerinin birbirine daha büyük bir kuvvetle yaklaşarak kompakt çapraz bağlı nanopartiküllerin oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir [119].

Bu çalışmada, 6 mg/mL KS konsantrasyonunda, sıcaklıktaki artış partikül boyutunu biraz arttırsa da bu artış istatistiksel olarak önemli değildir. Sıcaklık, KS ve TPP konsantrasyonunun birlikte artması boyutta daha yüksek bir artışa neden olmuştur.

Şekil 4.13'te T80 ile TPP konsantrasyonları arasındaki etkileşim (X4X5) gösterilmektedir; bu etkileşim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.13 Boyut için, T80 (X4) ve TPP (X5) arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi



Şekil 4.13 Boyut için, T80 (X4) ve TPP (X5) arasındaki ilişkiye diğer parametrelerin etkisi (devamı)

Şekil 4.13 incelendiğinde, TPP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak KS konsantrasyonunun (sıcaklık sabit tutulduğunda) artması partikül boyutunu daha da artırmıştır. Rathi ve ark. (2017), yükseltile KS konsantrasyonunun daha büyük KNP'lerin oluşumuna yol açtığını bildirmiştir [109]. Genel olarak, KS konsantrasyonunu azaltarak partikül boyutunu azaltmak mümkündür. KS konsantrasyonu arttıkça, KS çözeltisinin viskozitesinde artış olur. Yüksek viskozite, karıştırıcının kesme kapasitesini de sınırlar ve bu durum partikül boyutunu etkiler. KS ve TPP'nin konsantrasyonlardaki artış ile partikül boyutunun arttığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Gan ve ark. (2005) ile Nallamuthu ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada KNP eldesinde KS/TPP kütle oranının arttırdıklarında hem ortalama boyutta hem de zetapotansiyende bir artış olduğunu bildirmişlerdir [69,123].

KS konsantrasyonu 3 veya 6 mg/mL'ye sabitlendiğinde TPP ve T80 miktarındaki artış, sıcaklığa bağlı olarak partikül boyutunda kısmi bir artışa neden olmuştur. Öte yandan, KS konsantrasyonu 6 mg/mL olduğunda T80 konsantrasyonundaki artış partikül boyutunu arttırmıştır. KS konsantrasyonu 3 mg/mL olduğunda ise T80 konsantrasyonu artırılırsa (timol sabitken) boyut azalma eğilimi göstermektedir. KS ve T80 konsantrasyonu düşük tutulduğunda, TPP konsantrasyonundaki artış partikül boyutunu azaltmıştır. Liu ve Gaoa (2008) yaptıkları çalışmada, sabit bir KS konsantrasyonunda (1–5 mg/mL), TPP konsantrasyonun (0,25–2,0 mg/mL) artırılmasının daha küçük partikül boyutuna yol açtığını ifade etmişlerdir. Ayrıca KS'nin TPP'ye oranı sabitlendiğinde, partikül boyutunun reaktan konsantrasyonu ile birlikte arttığı sonucuna ulaşmışlardır [124]. KS konsantrasyonun yüksek olması (6 mg/mL) durumunda, TPP ve T80 konsantrasyonlarındaki artış ile ortalama partikül boyutu da artmıştır.

Özet olarak, nanoenkapsülasyon işleminde partikül boyutunu düşük tutmak için KS konsantrasyonu düşük tutulmalı ve KS ile çapraz bağlanma derecesini karşılamak için yeterli konsantrasyonda TPP kullanılmalıdır. Az veya çok miktarda kullanılan TPP konsantrasyonları partikül boyutunda artışa neden olmaktadır.

Ayrıca kullanılan yüzey aktif madde konsantrasyonu, emülsiyon oluşumunu ve yapısını, yüzey yükünü etkileyebildiği gibi çapraz bağlayıcı ajanın etkinliğini de kısıtlayabilmektedir.

4.2.3 Nanoenkapsülasyon Parametrelerinin Zetapotansiyel (mV) Üzerine Etkisi

Nanopartiküllerin yüzey yükünün göstergesi olan zetapotansiyel, onların fizikokimyasal ve biyolojik stabilitesi hakkında bilgi verir [101]. Genel olarak zetapotansiyel değerleri ± 30 mV dışında kalan partiküller stabil kolloidler olarak kabul edilir. Bu nedenle van der Waals kuvvetleri, Browian hareketi veya partikül-partikül etkileşimleri gibi agregasyona ve stabil yapıyı bozan kuvvetlere karşı daha az duyarlıdırlar [86,103]. Bu açıdan zetapotansiyel, TKNP'lerin elektrostatik itme yoluyla stabilitesini etkileyen önemli bir parametredir [117,125]. Tablo 4.15'te zetapotansiyel (mV) sonuçlarına göre ANOVA tablosu verilmiştir. ANOVA analizinde istatistiksel olarak önemsiz parametreler çıkarılarak basit bir regresyon modeli elde edilmiştir.

Tablo 4. 15 Zetapotansiyel (mV) sonuçlarına göre ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	986,815	328,9383	17,54299	0,0001
X2	194,6025	194,6025	10,37857	0,0073
X3	118,81	118,81	6,336393	0,0270
X4	673,4025	673,4025	35,914	< 0,0001
Kalıntı	225,005	18,75042		
Düzeltilme Toplamı	1211,82			
R²= 0,8143; Düzeltilmiş R²= 0,7679				

X₂ (Kitosan konsantrasyonu, mg/mL), X₃ (Timol konsantrasyonu, mg/mL), X₄ (Tween 80 konsantrasyonu, mg/mL), p<0,05 istatistiksel önemi gösterir, ANOVA varyans analizini ifade etmektedir.

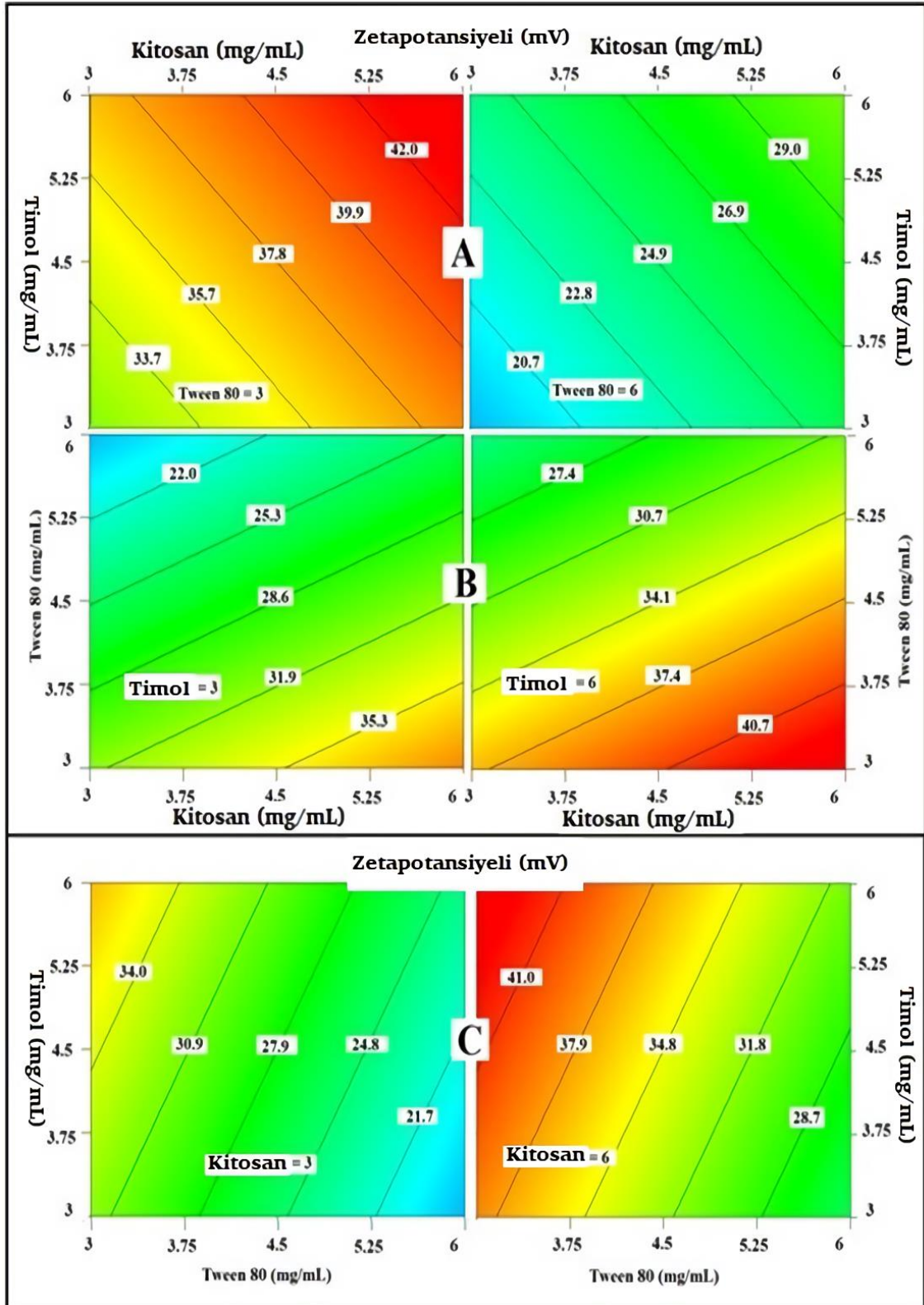
Tablo 4.15'e göre; KS, timol ve T80 konsantrasyonları zetapotansiyeli istatistiksel anlamda önemli (p<0,05) ölçüde etkilemiş, diğer parametreler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Ayrıca ikili etkileşimler içerisinde de istatistiksel anlamda bir ilişki gözlenmemiştir. Bu yüzden grafikler 3 boyutlu değil, dış hatlar plotu (contour) şeklinde verilmiştir. Yanıtlar için Düzeltilmiş R^2 değeri 0,7679 olarak bulunmuştur.

Regresyon denklemi istatistiksel olarak önemsiz parametrelerin modelden çıkarılmasından sonra uygun tek faktörlü etkileşim uygulanarak oluşturulmuştur. Zetapotansiyel için regresyon denklemi (4.6) aşağıda gösterilmiştir.

$$\begin{aligned} \textbf{Zeta Potansiyel} \\ = 32,175 + 2,325 * X_2 + 1,816667 * X_3 \\ - 4,325 * X_4 \end{aligned} \quad (4.6)$$

Şekil 4.14'ten nanonekapsülasyon prosesinde zetapotansiyeli (mV) etkileyen parametrelerin etkileşimleri dış hatlar plotu şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.14 Nanoenkapsülasyon prosesinde zetapotansiyeli (mV) etkileyen parametrelerin etkileşimleri

Şekil 4.14 A'da KS ve timol konsantrasyonları arasındaki etkileşim gösterilmektedir. KS ve timol konsantrasyonunun artması zetapotansiyeli (mV) arttırmıştır. Aynı koşullar altında T80 konsantrasyonunun 3'ten 6 mg/mL'ye çıkarılması zetapotansiyelin azalmasına neden olmuştur. Asasutjarit ve ark. (2013) tarafından iyonotropik jelasyon yöntemiyle diklofenak sodyum (DC) yüklü KNP'lerin üretildiği çalışmada, T80 konsantrasyonundaki artış partikül boyutunda artışa yol açarken, zetapotansiyelde azalmaya sebep olmuştur. Zetapotansiyeldeki azalma, T80 moleküllerinin partikül yüzeyinde birikmesi ve DC yüklü KNP'lerin yüzey yükünü koruması ile ilişkilendirilmiş ve bu varsayım DC yüklü KNP'nin sedimentasyon hızı ile doğrulanmıştır [126].

T80 konsantrasyonu 3 ve 6 mg/mL iken timol konsantrasyonunun artması ile zetapotansiyel de artış meydana getirmiştir. Ancak T80 konsantrasyonunu yüksek olduğu (6 mg/mL) durumda timol konsantrasyonunun artmasıyla elde edilen zetapotansiyel değeri daha düşüktür. Benzer şekilde T80 konsantrasyonu 3 ve 6 mg/mL seviyelerinde iken KS konsantrasyonunun artması zetapotansiyelde artışa neden olmuştur. Diğer taraftan, düşük T80 konsantrasyonunda (3 mg/mL) KS konsantrasyonunun artması zetapotansiyelde daha büyük artışa neden olmuştur.

Şekil 4.14 B'de KS ve T80 parametrelerinin etkileşimleri gösterilmektedir. KS konsantrasyonundaki artış zetapotansiyeli artırırken, T80 konsantrasyonundaki artış zetapotansiyelde azalmaya neden olmuştur. Aynı koşullar altında timol konsantrasyonunun 3 mg/mL'den 6 mg/mL'ye çıkarılması zetapotansiyelde kısmi bir artışa neden olmuştur. Timol konsantrasyonu 3 veya 6 mg/mL iken, T80 konsantrasyonunun artması zetapotansiyel değerinin azalmasına yol açmıştır. Timol konsantrasyonu 6 mg/mL iken, T80 konsantrasyonundaki artış zetapotansiyeli azaltsa da timol konsantrasyonunun artmasından dolayı daha yüksek değerler elde edilmiştir. Bu durum, negatif yüklü timolün konsantrasyonunun artmasıyla birlikte EE'nin artması, yani KS içerisinde daha fazla etken maddenin hapsolmasıyla açıklanabilir. Böylelikle pozitif yüzey yüküne sahip olan KS zetapotansiyel artışına neden olmuş olabilir.

Şekil 4.14 C’de timol ve T80 parametrelerinin etkileşimleri gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, T80 konsantrasyonundaki artış zetapotansiyeli azaltmıştır. Aynı koşullar altında KS konsantrasyonunun 3 mg/mL’den 6 mg/mL’ye yükseltilmesi zetapotansiyelde kısmi bir artışa neden olmuştur. Timol ve KS konsantrasyonlarının birlikte artması ile daha yüksek zetapotansiyel değerleri elde edilmiştir. Keawchaon ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, zetapotansiyel değeri ile KS/karvakrol oranı arasında yüksek korelasyon bulunmuştur [13]. Cansuoğlu ve Törnük (2016) tarafından yapılan çalışmada da esansiyel yağ yüklü KNP’ler için benzer sonuçlar bulunmuştur [93]. KS, polikasyonik bir bileşiktir ve yapısındaki amino gruplarının varlığı nedeniyle pozitif yüklüdür. Bu nedenle artan KS konsantrasyonu daha yüksek zetapotansiyel sağlar [28]. Timol yüklemesinin yüzey pozitif yükünü azaltması beklenmesine rağmen timol yüklenmesi EE’nin artmasına neden olmuştur. Böylece kapsüllenmeyen timol konsantrasyonunun azalmasından dolayı yüzey yükünde azalma meydana gelmemiştir. T80 konsantrasyonunun artması nanopartiküllerin sudaki dağılma stabilitesini azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Zetapotansiyel değerinde meydana gelen bu azalma bir dereceye kadar partikül yüzeylerindeki enkapsüle olmayan timolün bir sonucu olabilir.

4.3 Parametrelerin Optimizasyonu ve Tasarımın

Doğrulanması

Desirability (istenirlik), sistemin verdiği tüm cevapları tek bir fonksiyon altında toplar. Bu fonksiyon istenen cevaplara göre optimize edilir. Böylelikle çeşitli avantajlar elde edilir. Bunlar farklı skalalara sahip yanıtların incelenmesini ve tüm yanıtların tek bir fonksiyona dönüştürülebilmesini sağlar. Ayrıca kalitatif-kantitatif yanıtların etkin bir şekilde kullanılabilmesine de olanak verir. İstenirlik fonksiyonu için tüm yanıtlar 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt indeksidir. Her bir yanıt ayrı ayrı hesaplanır ve elde edilen tüm fonksiyonların geometrik ortalamaları alınarak tek bir istenirlik fonksiyonuna ulaşılır. Bu fonksiyonun kullanımı ile sonucun 1’e yaklaşması, belirlenen kriterlerin sağlanmış olduğunu ve modelin güvenilirliğini göstermektedir [127].

Tablo 4.16 TKNP'lerin optimize edilmiş formülasyonları

Sıra	S	K	T	T80	TPP	Boyut (nm)	ZP (mV)	EE (%)	D
1	44,17	3	5,99	3	0,75	338,2	37,0	67,8	0,91
2	44,36	3	6	3	0,74	338,8	37,1	67,7	0,91
3	39,11	3	6	3	0,75	343,6	37,1	65,6	0,9
4	36,44	3,05	6	3	0,75	351,1	37,2	64,3	0,8
5	45	3,38	6	3	0,62	383,2	37,9	63,8	0,88

S (sıcaklık, °C), K (kitosan konsantrasyonu, g), T (timol miktarı, mg/mL), T80 (tween 80 miktarı, mg/mL), TPP (TPP konsantrasyonu, mg/mL), D (Desirability, 0-1)

Nanopartiküllerin optimize edilmiş formülasyonu, Design-Expert yazılımı ile sayısal nokta tahmin yöntemi uygulanarak minimum partikül boyutu, sıfırdan en uzak zetapotansiyel değeri ve maksimum EE'ye ulaşma kriterleri temelinde seçilmiştir. Tablo 4.16'da sayısal nokta tahmin yöntemi ile optimize edilmiş TKNP formülasyonları verilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında, minimum partikül boyutu, sıfırdan en uzak zetapotansiyel ve maksimum EE'yi veren optimum koşullar şu şekilde hesaplanmıştır: KS konsantrasyonu 3 mg/mL; timol konsantrasyonu 5,99 mg/mL, T80 konsantrasyonu 3 mg/mL, TPP konsantrasyonu 0,75 mg/mL, sıcaklık 44,17 °C. Optimizasyon süreçlerinde doğruluk kriteri olan istenirlik 0,907 olarak bulunmuştur. Bu değer 1'e oldukça yakındır. Bu da iyi arzu edilebilirlik oranını göstermektedir. Tablo 4.16'da optimizasyon sonucu elde edilen TKNP'lerin istenirlik değerleri verilmiştir. Optimize edilmiş formülasyonda partikül boyutunun 338,2 nm, zetapotansiyelin 37 mV ve EE'nin % 67,8 olması öngörülmektedir (Tablo 4.16).

İyonik jelasyon yöntemi kullanılarak optimize edilen formülasyonun doğrulanması ve farklı biyoaktif bileşenlerle yüklü KNP'lerin bazı fizikokimyasal özellikleri ile kıyaslanması Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17 İyonik jelasyon yöntemi kullanılarak optimize edilen formülasyonun doğrulanması ve farklı biyoaktif bileşenlerle yüklü kitosan nanopartiküllerin bazı fizikokimyasal özellikleri ile kıyaslanması

Parametre	Değerler			
Boyut (nm)	317,4 ±39,7	532-717	723-760	210-255
Zetapotansiyel (mV)	35,5 ±1,3	25-29	16-33	27-34
EE (%)	64,1 ±3,16	14-31	2-20	48-59
Referans	Bu çalışma	[13]	[66]	[69]

Önerilen modeli doğrulamak için, optimize edilmiş formülasyon kullanılarak üç deney gerçekleştirilmiş ve deneme sonuçlarında ortalama partikül boyutu 317,4±39,7 nm, zetapotansiyel 35,5±1,3 mV ve EE % 64,1±3,1 olarak bulunmuştur. Deney değerlerinin (Tablo 4.17), Tablo 4.16’da verilmiş tahmin edilen değerlerle önemli ölçüde uyumlu olduğu bulunmuştur. Tablo 4.17’de görüldüğü gibi, timol gibi biyoaktif bileşenlerle yapılan bazı çalışmalarda EE ve zetapotansiyel değerleri bu çalışmada elde edilen değerlerden daha düşüktür.

Bazı uçucu yağlar fenolik bir bileşik olarak timol içerir. Timol içeren çeşitli bitki uçucu yağlarının nanoenkapsülasyonu amacıyla iyonik jelasyon yöntemi ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan *Satureja hortensis* L. (% 35-40) [93], *Carum copticum* (% 7-27) [111], *Thymus vulgaris* (30,67 ± 1,62) [21], *Zataria multiflora* (% 3-45) [20] ve *Oregano* (% 5 - 25) [112] uçucu yağının EE değerleri bu çalışmadaki bulgularından daha düşüktür.

4.4 Optimum Koşullarda Üretilen TKNP’lerin

Karakterizasyonu

Nanopartiküller farklı enkapsülasyon teknikleri kullanılarak sentezlenmektedir. Böylelikle elde edilen nanopartiküllerin gıda maddelerine dahil edilmesi ile gıdaların daha “işlevsel” hale gelmesi istenmektedir. Nanopartiküllerin herhangi bir gıdaya dahil edilmesinden önce, nanoboyutta ürünün davranışını karakterize etmek gerekir. Bu kısımda TKNP’lerin karakterizasyonu için çeşitli teknikler ile araştırmalar yapılmıştır.

Bir önceki bölümde parametrelerin optimize edilmesi ile en düşük boyutta (nm), sıfırdan en uzak zetapotansiyel (mV) değerinde ve en yüksek EE'ye (%) sahip TKNP'ler elde edilmiştir.

4.4.1. Partikül Boyutu ve Zetapotansiyel

Tablo 4.18'de timol yüklü olan ve olmayan (kontrol örneği) KNP'lerin ortalama boyut (nm), PDI (polidispersite) ve zetapotansiyel (mV) sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.18 KNP ve TKNP'nin boyut (nm), polidispersite indeksi (PDI), zetapotansiyel (mV) değerleri

NP	Boyut (nm)	PDI	ZP (mV)
KNP	264±36,1 ^a	0,45±0,03 ^a	32,7±0,7 ^a
TKNP	317,4± 39,7 ^a	0,46± 0,1 ^a	35,5± 1,3 ^a

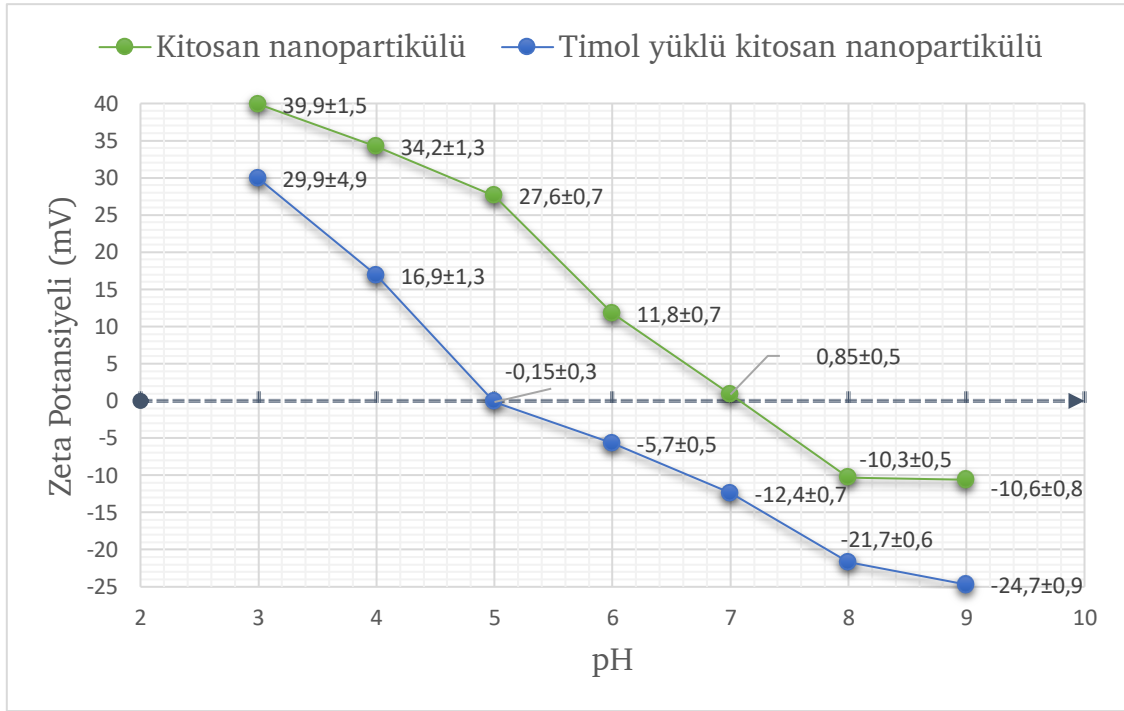
KNP: Kitosan nanopartikülü; TKNP: Timol yüklü kitosan nanopartikülü; ZP: Zetapotansiyel; a-b: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0,05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.18 incelendiğinde KNP'lere timolün kapsüllenmesiyle boyut, zetapotansiyel ve PDI değerleri artmaktadır. Timol içermeyen KNP'ler, 3,0 mg/mL'lik bir KS ve 0,75 mg/mL TPP çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. KS/TPP kütle oranı 4/1 ve reaksiyonun pH'sı 4,6'dır. Bu koşullar altında, SEM ile ölçülen çapa (150-250) benzer hidrodinamik çapa (boyut = 264±36,1) sahip NP'ler elde edilmiştir. Polidispersite indeksi (PDI) değeri 0,45±0,03 ve zetapotansiyel 32,7±0,7 mV olarak bulunmuştur (Tablo 4.18). Koukaras ve ark. (2012) yaptığı çalışmada, 2,0 mg/mL KS çözeltisinde K/TPP kütle oranında 6/1 olacak şekilde oluşturdukları KNP'lerin boyutunu 500 nm bulmuştur [128]. Timol eklenmesiyle birlikte boyut(nm), zetapotansiyel(mV) ve PDI değerleri artış göstermiştir. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Keawchaoon ve Yoksan (2011) yaptıkları çalışmada, KNP'ler içerisine timolün bir izomeri olan karvakrolü enkapsüle etmişlerdir. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında, daha yüksek bir boyut (520 nm) ve zetapotansiyeline (42 mV) sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Bu fark, kullanılan KS'nin konsantrasyon ve moleküler ağırlığı farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Bununla birlikte, karvakrol ilave edilmesiyle KNP'ye göre sıfıra daha yakın zetapotansiyel değeri elde edildiği bildirilmiştir. Timolün zetapotansiyel üzerindeki etkisi ise karvakrol için gözlemlenen etkinin tersi olmuştur [13]. Ancak Medina ve ark. (2019) TKNP'leri yenilebilir film eldesinde kullandığı çalışmada, timol miktarının artmasıyla zetapotansiyel değerinin pozitif olarak arttığı sonucunu bulmuşlardır [8]. Medina ve ark. (2019) yaptığı çalışmada elde ettikleri sonuçlar bu araştırmada elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Zetapotansiyel, bir parçacığın belirli bir ortamda elde ettiği toplam yükün ölçüsüdür ve bir kolloidal sistemin potansiyel stabilitesinin bir göstergesidir [129]. Aynı zamanda kolloidal bir çözeltinin elektrostatik etkileşimini ve hareketliliğini de açıklar. Elektrostatik itme etkileşimi, çözeltinin kararlılığını ölçmek ve kontrol etmek için kullanılır. Böylelikle dispersiyon, agregasyon veya flokülasyonun nedenleri açıklanabilir ve elektrostatik itme etkileşimi kolloidal çözeltinin koşullarını iyileştirmek için kullanılabilir. Van der Waals kuvvetlerinde molekül arasındaki mesafe kısaldığında elektrik yüküne hükmetmektedir ve agregasyona neden olmaktadır [37].

Bu çalışmada, liyofilize TKNP ve KNP'lerin farklı pH değerlerindeki stabilitesi hakkında fikir sahibi olabilmek amacıyla pH 3 ve 9 arasında zetapotansiyel değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.15'de KNP ve TKNP'lerin asidik (pH 3) ile alkalın (pH 9) arasındaki titrasyon grafiği gösterilmektedir. Süspansiyona NaOH ilavesiyle pH arttıldığında KNP ile TKNP'lerin zetapotansiyeli sırasıyla 40 mV'dan ~ -10 mV'a, 30 mV'dan ~ -25mV'a kadar düşmüştür.



Şekil 4.15 KNP ve TKNP'lerin titrasyon grafiği

Titrasyonda pozitif yükün negatif yükler tarafından tamamen nötrleştirildiği bir noktaya ulaşılmıştır. Bu nokta, parçacığın net yükünün sıfır olduğu ve pratik açıdan çok önemli olduğu pH olarak tanımlanan izoelektrik nokta (PI) olarak bilinmektedir [69,106]. TKNP'nin PI'sinin pH 5, KNP'nın ise PI'sinin pH 7 olduğu ve bu pH değerlerinde net yükün sıfır olduğu dolayısıyla bu noktada en az stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da nanopartikülün gıda sistemlerinde kullanılacağı pH aralığı hakkında bilgi vermektedir. Nallamuthu ve ark. (2015) yaptığı çalışmada, KNP'lerin izoelektrik noktaya pH 7,66'da ulaştığını bulmuşlardır. Bu noktada, bu nanopartiküllerin en az stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir. Zetapotansiyelde meydana gelen değişiklik, alkali ilavesiyle partiküllerin negatif yükler kazanma eğiliminde olmalarından kaynaklanabilir [69]. Nanopartiküllerin bulunduğu ortam pH'sının değişmesiyle zetapotansiyel değerleri de değişmektedir.

4.4.2. Enkapsülasyon Etkinliği, Şişme İndeksi ve Partikül Verimi

TKNP'lerin kapsülleme verimliliği (EE), Şişme indeksi (SI) ve partikül verimi (YP) Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4.19 TKNP'lerin kapsülleme verimliliği (EE), Şişme indeksi (SI) ve partikül verimi (YP)

NP	GC-EE (%)	UV-EE (%)	SI (%)	YP (%)
TKNP	62,53±0,3	64,1±3,16	6,7± 0,3 ^a	30,8±2,76
KNP	-	-	2.81 ± 0,03 ^b	-

TKNP: Timol yüklü kitosan nanopartikülü; KNP: Kitosan nanopartikülü; GC-EE; Gaz kromatografisi kullanılarak hesaplanan Enkapsülasyon Etkinliği; UV-EE: UV-spektrofotometre kullanılarak hesaplanan Enkapsülasyon Etkinliği; SI: Şişme İndeksi; YP: Partikül verimi; a-b: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir.

İyonik jelasyon süreci ve çapraz bağlama yoğunluğu hakkında daha fazla bilgi edinmek için ve kapsülleme işleminin iyonik jelasyon süreci üzerindeki etkisini değerlendirmek için şişme indeksi (SI) incelenmiştir. NP'lerin şişmesi, esas olarak nanopartiküllerin oluşumu sırasında KS zincirleri ve TPP arasındaki iyonik etkileşimlerden etkilenir. Çapraz bağlanma yoğunluğundaki artışın şişmede bir azalışa neden olduğu, yani SI ve çapraz bağlamanın ters orantılı olduğu bildirilmektedir [130]. Tablo 4.19 incelendiğinde, KNP için bu değer $2,81\pm0,03$ olarak ölçülürken, TKNP'nin ise daha yüksek SI değerine sahip olduğu görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum, timol yüklenmesiyle çapraz bağlama yoğunluğunda azalma olduğunu ifade etmektedir. Shetta ve ark. (2019) tarafından KNP'ler içerisine nane ve yeşil çay esansiyel yağlarını enkapsüle ettiği çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir [17], ancak bizim çalışmamızda daha düşük SI değerleri bulunmuştur. Bu durumda, daha etkin bir çapraz bağlanma olduğu söylenebilir. Bu çalışmada optimize koşullarda elde edilen nanopartikülün verimi ($\%30,8\pm2,76$) Tablo 4.19'da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, Das ve ark. (2019) (%30,89) [131] ile Hasheminejad ve ark. (2019) (% 28,18) [67] tarafından rapor edilen bulgularla benzerlik gösterirken, Rahaiee ve ark. (2015) [101]'nın elde ettiği partikül veriminden (%48,33) daha düşüktür. Nanopartikül verimindeki bu farklılıklar büyük ölçüde KS'nin molekül ağırlığı, konsantrasyonu, kapsüllenecek malzemenin türü ve KNP hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcı ajanın miktarı gibi faktörlerden etkilenmektedir [131].

TKNP'nin EE'sini doğrulamak için GC-MS yöntemiyle de ölçümler yapılmıştır. UV spektrofotometre kullanılarak EE hesaplanırken, duvar materyali parçalanmış ve kapsüllenen timol açığa çıkarılarak spektrofotometre vasıtasıyla absorbansı ölçülmüştür. GC-MS kullanılarak EE hesaplanırken farklı bir yaklaşım izlenmiştir. Nanopartiküller santrifüj edilmiş ve yıkanmış kapsüllenmeyen timol yıkama suyuna geçmiştir. GC-MS ile kapsüllenmeyen timol miktarı belirlenerek toplam timol miktarından çıkartılmış ve partikülün kapsüllediği timol miktarı tespit edilmiştir. Cui ve ark. (2018) tarafından karanfil yağının KNP'leri içerisinde enkapsüle ettiği ve jelatin kullanarak kapsüllerden nanolif üretildiği çalışmada, farklı oranlardaki karanfil yağı içeren nanopartiküllerin EE değerleri GC-MS ile % 21,1 ile % 36,2 arasında bulmuştur. Tablo 4.19 incelendiğinde, bu çalışmada her iki yöntemle elde edilen EE değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Bu da elde edilen EE değerinin doğruluğunu kuvvetlendirmektedir.

4.4.3. Antibakteriyel Aktivite

TKNP'lerin antibakteriyel aktivitesi, agar difüzyon yöntemi kullanılarak Gram-negatif iki bakteri, *S. Typhimurium* ve *E. coli* O157:H7 ile Gram-pozitif iki bakteri, *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'e karşı test edilmiştir. Kontrol olarak KNP'ler de analiz edilmiş olup sonuçlar Tablo 4.20'de gösterilmiştir.

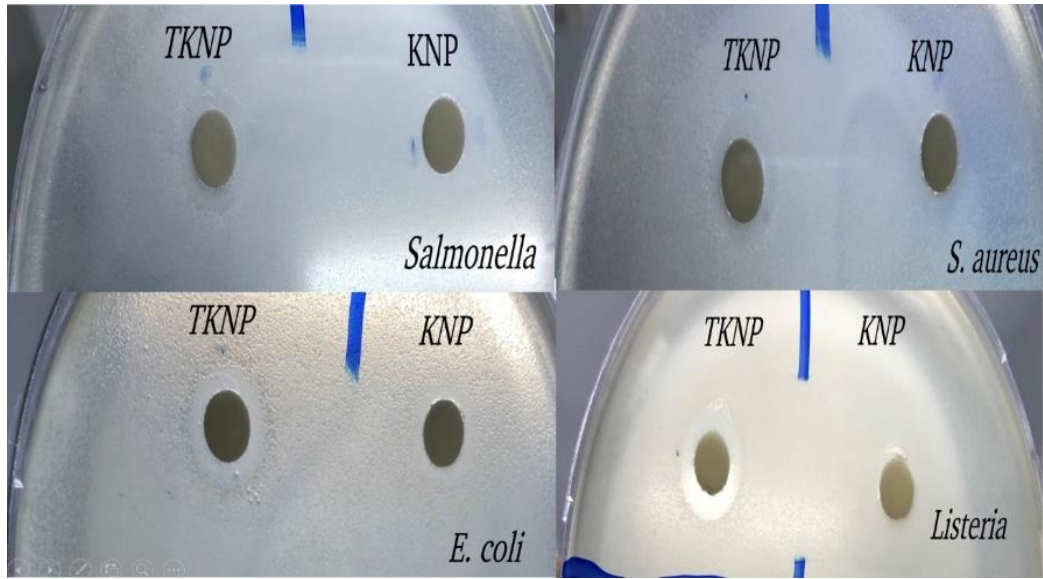
Tablo 4.20 KNP ve TKNP'lerin antibakteriyel aktiviteleri

Örnek	Büyüme inhibisyon bölgesi (mm)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	<i>S.</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 33150
TKNP	10,7±0,6 ^a	12,3±0,6 ^a	10,7±0,6 ^a	11±1,0 ^a
KNP	10,3±1,0 ^a	9,3±0,6 ^b	9,7±0,6 ^a	9,7±0,6 ^a

TKNP: Timol yüklenmiş kitosan nanopartikülü KNP: Kitosan nanopartikülü

a-b: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0,05$) olduğunu göstermektedir

Tablo 4.20'de görüldüğü gibi, TKNP'lerin antibakteriyel etkisi genel olarak KNP'lerden daha yüksek olsa da istatistiksel olarak *L. monocytogenes*'e karşı tespit edilen antibakteriyel etkilerin arasında anlamlı bir fark oluşmuştur ($p<0,05$). Divya ve ark. (2017), KS (3 mg/mL) ile % 1'lik TPP (w/v) kullanılarak elde ettiği nanopartiküllerin *S. aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisinin *E. coli*'ye karşı belirlenen etkiden daha yüksek olduğunu bildirmiştir [132]. Medina ve ark. (2019) TKNP ve KNP'lerin *S. Typhimurium*, *S. aureus* ve *L. innocua* üzerindeki etkilerini incelediği çalışmada, KNP en yüksek antibakteriyel etkisi *S. aureus* üzerine gerçekleşirken TKNP en yüksek antibakteriyel etkiyi *L. innocua* üzerinde göstermiştir [8]. TKNP ve KNP'lerin test edilen patojen bakterileri içeren petriler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonlarına ait görseller Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16 TKNP ve KNP'lerin oluşturduğu büyüme inhibisyonu örnekleri

TKNP'ler ile KNP'lerin 2 farklı test bakterisine (*S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*) karşı etkileri, sıvı besiyeri yöntemi kullanılarak da test edilmiştir. Bu çalışmada 2 farklı nanopartikül konsantrasyonu (%1 ve %2 v/v) çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, sırasıyla Tablo 4.21 ve 4.22'de verilmiştir.

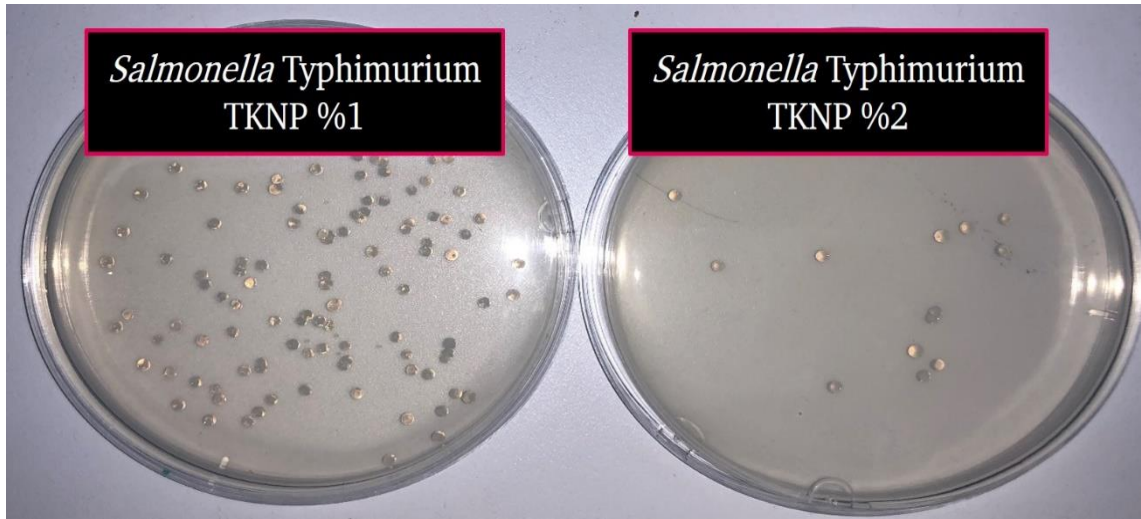
Tablo 4.21 TKNP ve KNP'lerin farklı seviyelerinin (%1 ve %2) *Salmonella* Typhimurium 'a karşı antimikrobiyal etkisi.

Örnek	<i>Salmonella</i> Typhimurium (log 10 kob/mL)	
	Süre (saat)	
	0.	24.
Kontrol	6,85±0,02 ^{Ba}	8,74±0,04 ^{Aa}
TKNP %1	6,85±0,02 ^{Ba}	7,08±0,03 ^{Ad}
TKNP %2	6,85±0,02 ^{Aa}	6,16±0,07 ^{Be}
KNP %1	6,85±0,02 ^{Ba}	7,77±0,02 ^{Ab}
KNP %2	6,85±0,02 ^{Ba}	7,54±0,01 ^{Ac}

TKNP; timol yüklü kitosan nanopartikülü, KNP; Kitosan nanopartikülü
a-e aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0,05$) olduğunu göstermektedir; A-B:Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p<0,05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.21'de görüldüğü gibi, örneklerin başlangıç *S. Typhimurium*'un yükleri 6,85 log kob/mL olarak bulunmuştur. Hiçbir aktif madde içermeyen kontrol örneğindeki bakteri sayısı 24 saatlik inkübasyon sırasında yaklaşık 2 logaritmik birimlik bir artış göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

TKNP ve KNP'lerin %1 ve %2 (v/v)'lik seviyeleri bakteriyel eliminasyon sağlamamış olsalar bile kontrole karşı kıyaslandıklarında istatistiksel olarak önemli seviyede bir bakteriyostatik etki göstermişlerdir ($p < 0.05$). Kontrol örnekleri ile kıyaslandıklarında TKNP ve KNP'lerde 24 saatte bakteri sayılarında istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) azalmalar sağlarken, en düşük etkiyi KNP'nin %1 (v/v)'lik seviyesi, en yüksek etkiyi TKNP'nin %2 (v/v)'lik seviyesi göstermiştir. Şekil 4.17'de TKNP'nin %1 ve %2' lik seviyelerinin *S. Typhimurium*'un (10^{-4} dilüsyonunun) besiyerindeki gelişimine etkisi görülmektedir.



Şekil 4.17 TKNP'nin %1 ve %2'lik seviyelerinin *Salmonella Typhimurium*'un besiyerindeki gelişimine etkisi

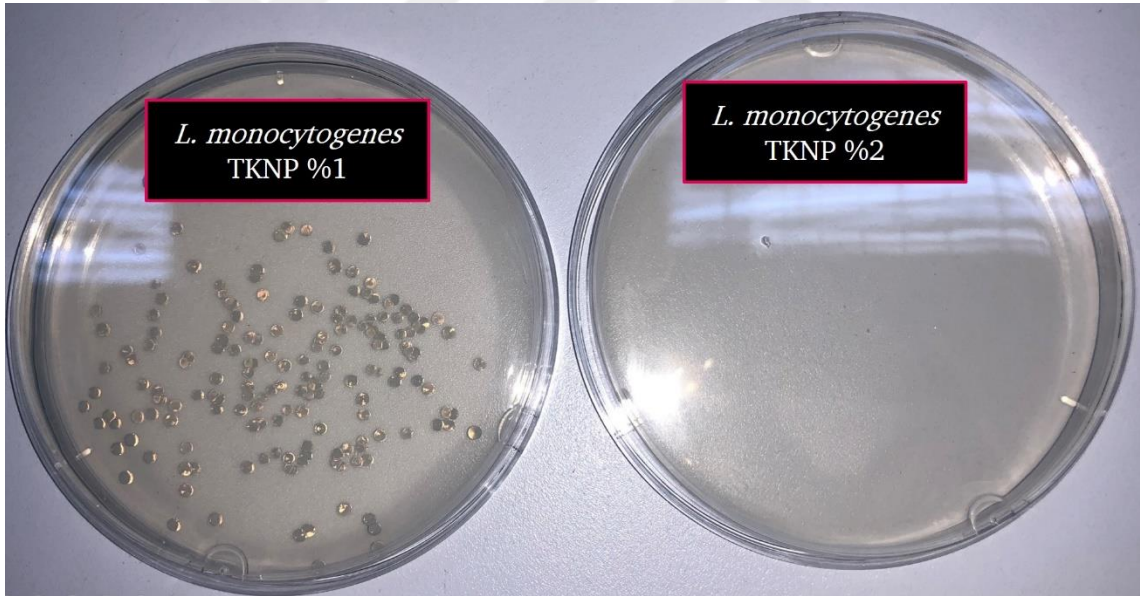
Tablo 4.22 TKNP ve KNP'lerin farklı seviyelerinin (%1 ve %2) *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisi

	<i>L. monocytogenes</i> sayısı (log 10 kob/mL)	
	Süre (saat)	
Örnek	0.	24.
Kontrol	$6,68 \pm 0,05^{Ba}$	$9,23 \pm 0,00^{Aa}$
TKNP %1	$6,68 \pm 0,05^{Ba}$	$7,19 \pm 0,03^{Ad}$
TKNP %2	$6,68 \pm 0,05^{Aa}$	$< 1,00^{Be}$
KNP %1	$6,68 \pm 0,05^{Ba}$	$7,60 \pm 0,04^{Ab}$
KNP %2	$6,68 \pm 0,05^{Ba}$	$7,36 \pm 0,03^{Ac}$

TKNP; timol yüklü kitosan nanopartikülü, KNP; Kitosan nanopartikülü
a-e aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğunu göstermektedir; A-B:Aynı satırdaki birbirinden farklı olan büyük harfler veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p < 0,05$) olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.22'de görüldüğü gibi, örneklerin başlangıç *L. monocytogenes* yükleri $6,68 \log \text{ kob/mL}$ 'dir.

Hiçbir aktif madde içermeyen kontrol örneğindeki bakteri sayısı, 24 saatlik inkübasyon sırasında yaklaşık 2,5 logaritmik birimlik bir artış göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. KNP'lerin %1 ve %2'lik seviyeleri, inkübasyon sırasında bakteriyel eliminasyon sağlamamış olsalar bile kontrol ile kıyaslandıklarında istatistiksel olarak önemli seviyede bir bakteriyostatik etki göstermişlerdir ($p < 0.05$). TKNP'lerin %2(v/v)'lik seviyesini içeren ortamda bakteri sayısı 24 saat sonunda sayılabilir düzeyin altında bulunmuştur. Kontrol örnekleri ile kıyaslandıklarında TKNP ve KNP'lerde 24 saatte bakteri sayılarında istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) azalmalar sağlanırken, en düşük etkili olan örnek KNP %1, en yüksek etkili örnek ise TKNP %2 olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.18'de TKNP'nin %1 ve %2' lik seviyelerinin *L. monocytogenes*'in (10^{-4} dilüsyonunun) besiyerindeki gelişimine etkisi gösterilmiştir.



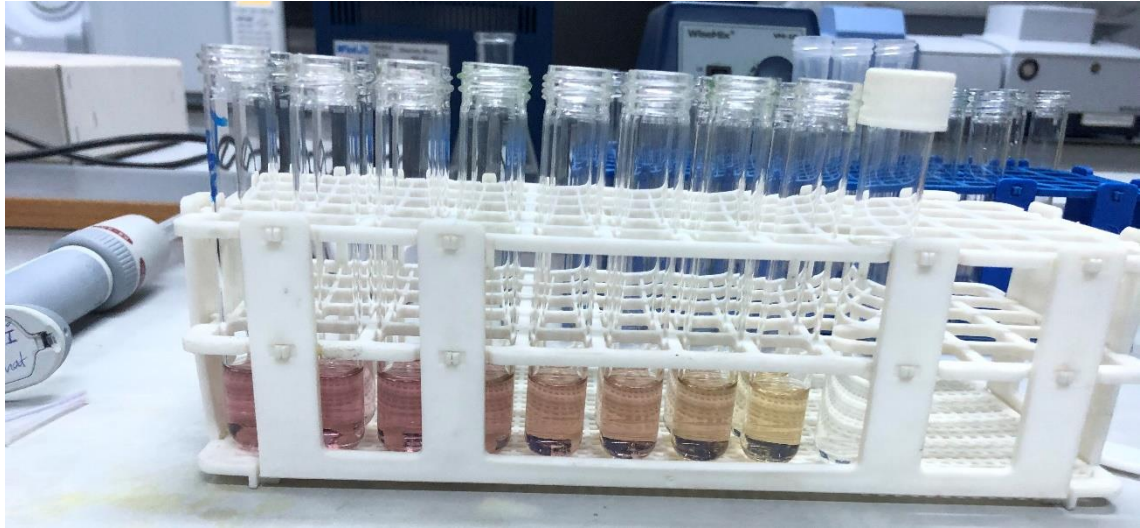
Şekil 4.18 TKNP'nin %1 ve %2'lik seviyelerinin *L. monocytogenes*'in besiyerindeki gelişimine etkisi

Hosseinnejad ve Jafari (2016), KS'nin antimikrobiyal aktivitesine neden olabilen çeşitli mekanizmaları şu şekilde özetlemiştir: Pozitif yüklü KS molekülleri, bakteriyel yüzeyde negatif yüklü fosfolipid tabakasıyla ya da mikrobiyal DNA ile etkileşime girerek hücrede kalıcı değişikliklere yol açabilirler.

KS, hücre duvarında besin maddelerinin hücreye girmesini önleyen bir polimer membran oluşturması veya aerobik bakterilerin çoğalmasını engelleyen bir oksijen bariyeri görevi görerek ya da bakterinin kullanacağı besin bileşenleriyle şelat oluşturarak mikrobiyal büyümeyi önleyebilmektedir [73,133]. Timolün antimikrobiyal etkisi ise lipofilik doğasından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden timolün aktivitesi mikrobiyal hücrelerin lipid içeren fraksiyonlarında gerçekleşir ve timol membranın geçirgenliğini değiştirerek hücre içi stabilitenin yok olmasına neden olur ve/veya hücre solunum zincirini inhibe edebilir [134]. Ayrıca pozitif zetapotansiyel, nanopartiküllerin negatif yüklü hücrelere biyolojik olarak yapışmasını sağlamaktadır. Böylece fosfolipid membranlar ile biyolojik etkileşimi kolaylaştırmaktadır [135].

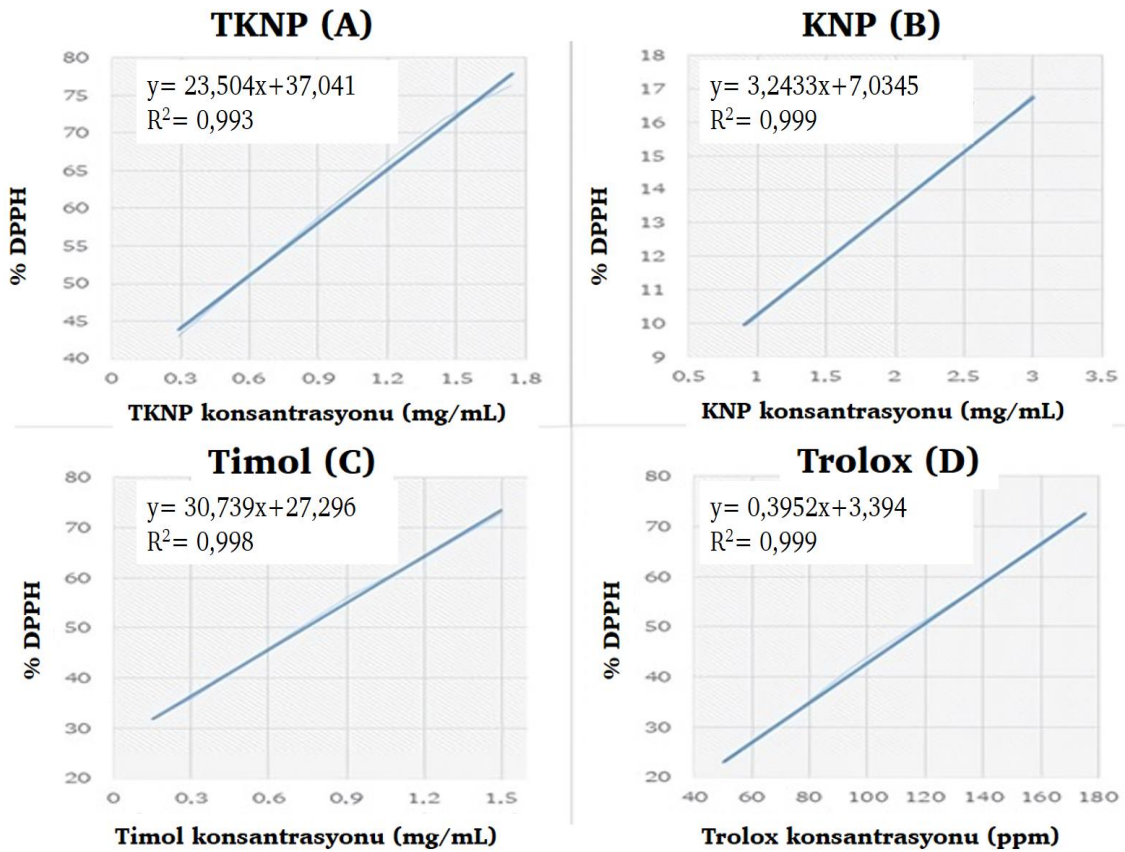
4.4.4. Antioksidan Aktivite (AOA)

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme aktivitesi metodu, antiradikal aktivite tayinlerinde yaygın olarak kullanılmakta olup kolay, ucuz ve oldukça kısa sürede sonuç veren bir yöntem olarak bilinmektedir. DPPH radikali 517 nm’de en yüksek absorbanşı veren ve koyu menekşe rengine sahip serbest bir radikaldir (Şekil 4.19).

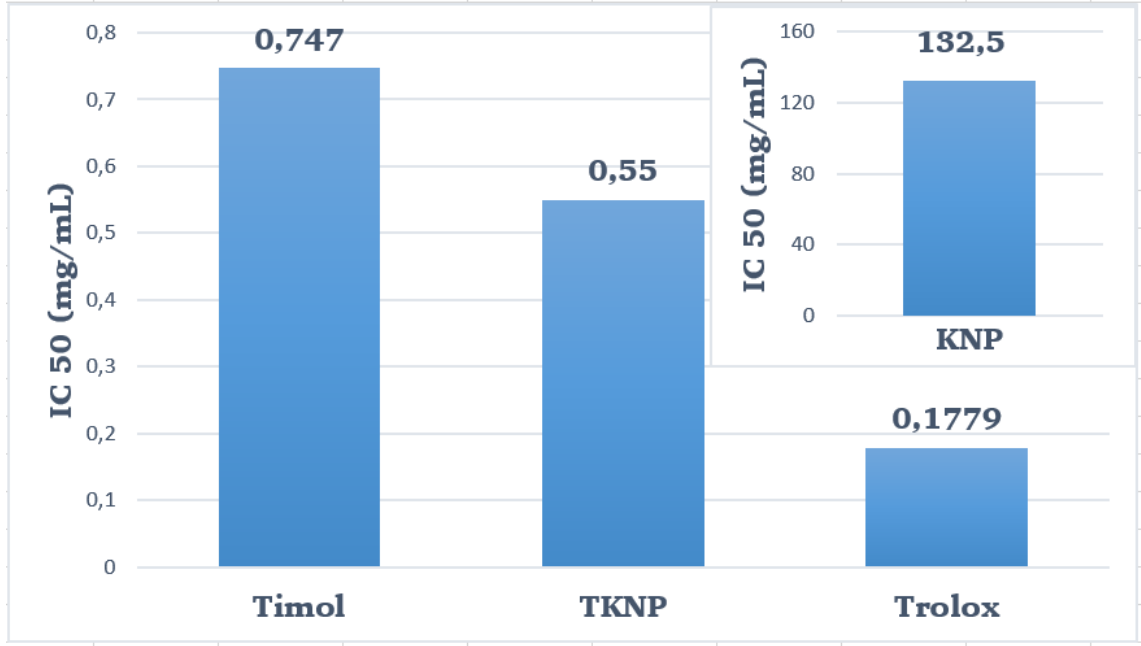


Şekil 4.19 Farklı konsantrasyonlardaki TKNP’lerin DPPH’in koyu menekşe rengine meydana getirdiği açılma

Bu yöntem antioksidan madde eşliğinde absorbanstaki azalmanın tespit edilmesi ile antioksidan aktivitenin ölçümü prensibine dayanmaktadır. Bu çalışmada saf timol, KNP ve TKNP'lerin DPPH radikali inhibisyon aktiviteleri belirlenmiştir. Farklı TKNP, KNP, timol ve troloks konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH inhibisyon aktiviteleri grafike edilerek IC50 değerlerinin hesaplanması için çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.20'de verilmiştir. IC50 değeri, maksimum absorbanz değerinin yarısına karşılık gelen aktif madde konsantrasyonunu vermektedir. Şekil 4.21'de saf timol, KNP'leri ve TKNP'lerin IC50 değerleri verilmiştir. Bu değerler troloks ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.20 TKNP(A), KNP(B), Timol (C) ve Trolox (D) 'un IC50 değerlerinin hesaplanması için çizilen kalibrasyon grafikleri



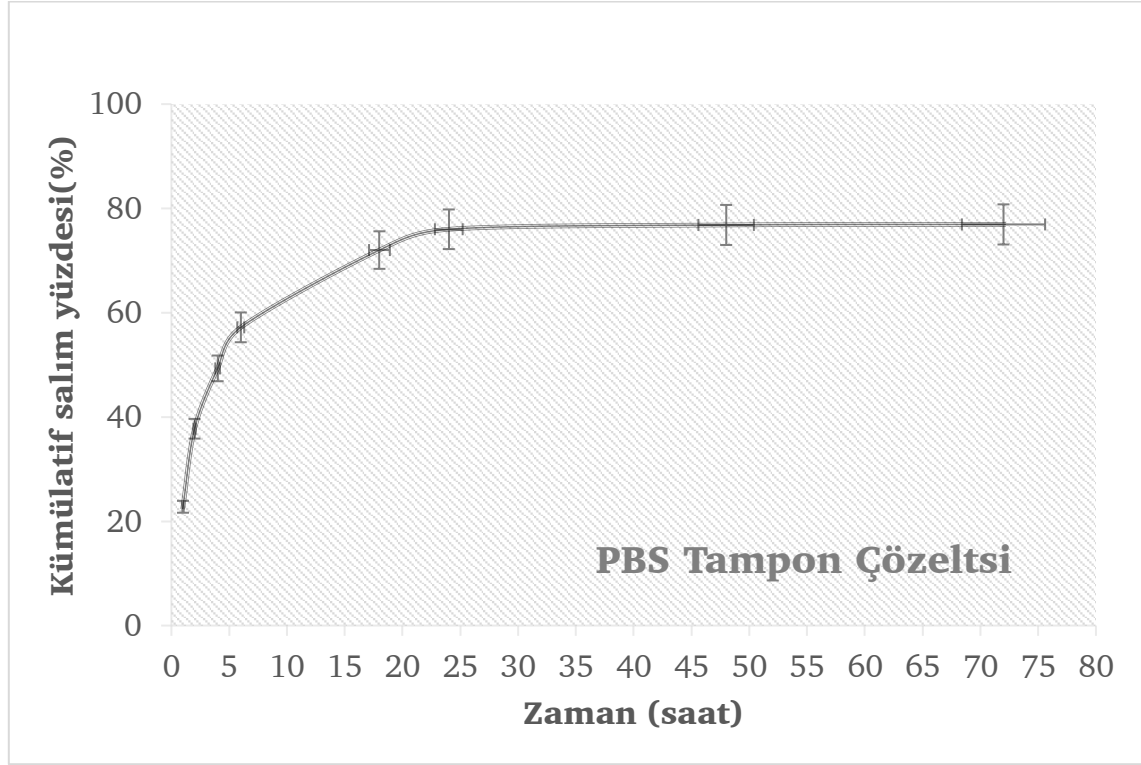
Şekil 4.21 Troloks, timol, KNP ve TKNP'lerin IC₅₀ değerleri

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi KNP belirgin DPPH radikal süpürme kabiliyeti göstermemiştir. KNP'lerin KS'nin molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak sınırlı bir antioksidan kabiliyetinin olduğu bildirilmiştir [136]. KS zincirlerinin antioksidan aktivitesi, serbest radikallerle reaksiyona girebilen hidroksil ve amino gruplarıyla ilgilidir. KNP, KS amino grubu ile TPP polianyonu arasındaki çapraz bağlanma nedeniyle yüksek IC₅₀ (132,5 mg/mL) değeri göstermiş olabilir [115].

Saf timol (0,747 mg/mL) ile TKNP (0,55 mg/mL) kıyaslandığında TKNP'lerin saf timolden daha düşük IC₅₀ değeri gösterdiği görülmektedir. Bu, daha yüksek bir antioksidan aktivite anlamına gelmektedir. Kapsülleme işleminin koruyucu etkisinin test sırasında timolün kontrollü salımı yoluyla buharlaşma hızını azaltmasıyla yorumlanabilir. Bununla birlikte TKNP'nin daha yüksek antioksidan aktivite göstermesi, nanoboyutlu yapıların daha geniş yüzey alanına sahip olmasından dolayı daha fazla DPPH radikali ile etkileşime girmelerinden de kaynaklanabilir [131]. Shetta ve ark. (2019) nane uçucu yağının KNP'ler içerisine kapsüllenmesi ile IC₅₀ değerlerinin 3,25 mg/mL'den 1,61 mg/mL'ye düştüğünü bildirmiştir [17]. Bu bulgular, bu çalışma sonuçlarını desteklemektedir.

4.4.5. *In vitro* salım

TKNP'lerin farklı zaman aralıklarında (1, 2, 4, 6, 18, 24, 48,72 saat) ve farklı pH değerlerindeki (pH 3 ile 7) *in vitro* salım profilleri sırasıyla Şekil 4. 22 ve Şekil 4.23 'de gösterilmiştir. *In vitro* salım ortamındaki timolün salımı, vücut sıvımızı simüle eden fosfat tamponu (pH 7.4) ve asidik gıdalarda içerisinde kullanımını incelemek için asetat tamponu (pH 3.0) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

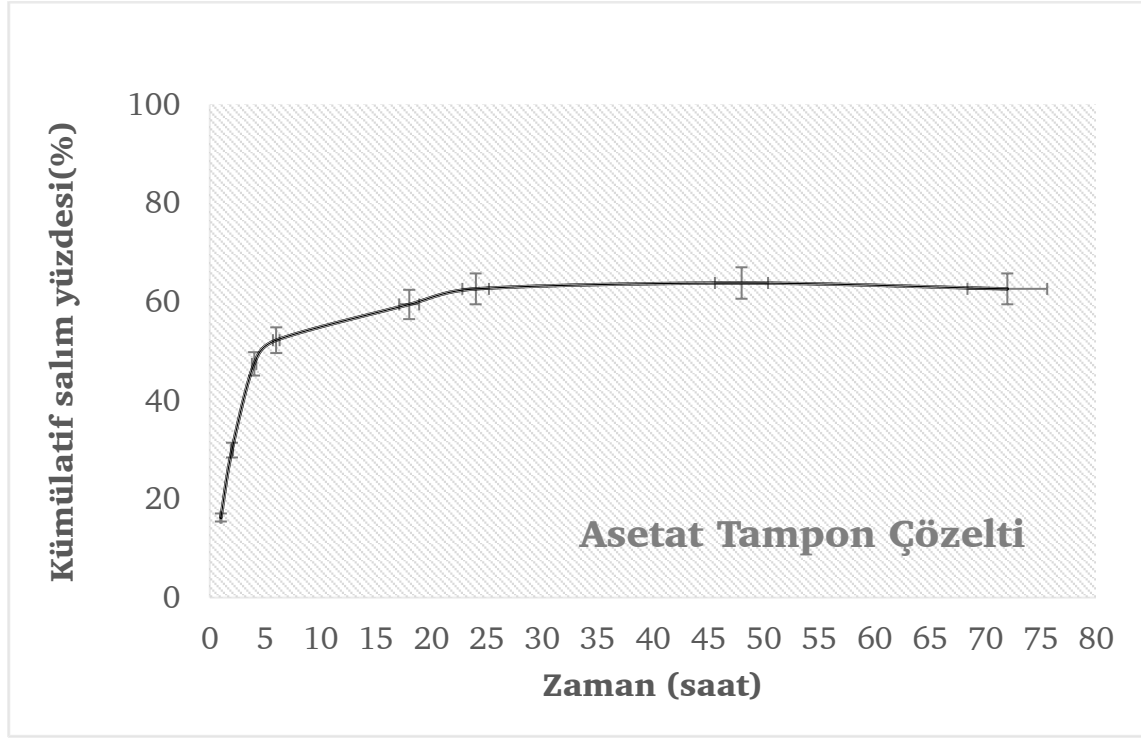


Şekil 4.22 pH 7,4 (PBS tampon çözeltisi) ortamında TKNP'lerin *in vitro* salım profili

Şekil 4.22'de görüldüğü gibi salım, hızına bağlı olarak iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada timol 6. saate kadar hızlı bir şekilde salınmıştır. Bu aşamada timolün % 57,2 'sinin partikülden ayrıldığı görülmüştür. Timolün bu aşamada serbest bırakılması, nanopartiküllerin yüzeyine yapışmış ve/veya kapsüllenmiş timolün ayrılmasından kaynaklanmış olabilir [112]. İkinci aşamada timolün salımı daha yavaş bir şekilde gerçekleşmiş olup, 72. saate kadar toplam timolün % 76,9'unun sistemi terk ettiği görülmektedir.

Bu durum, tampon çözeltinin nanopartiküllere nüfuz ederek stabilitelerini ortadan kaldırması sonucu polimerin şişmesine ve böylece KNP'ler içerisinde hapsedilmiş timolün difüzyona uğramasına atfedilebilir.

TKNP' nin pH 3 değerindeki asetat tampon çözelti içerisinde *in vitro* salım profili Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



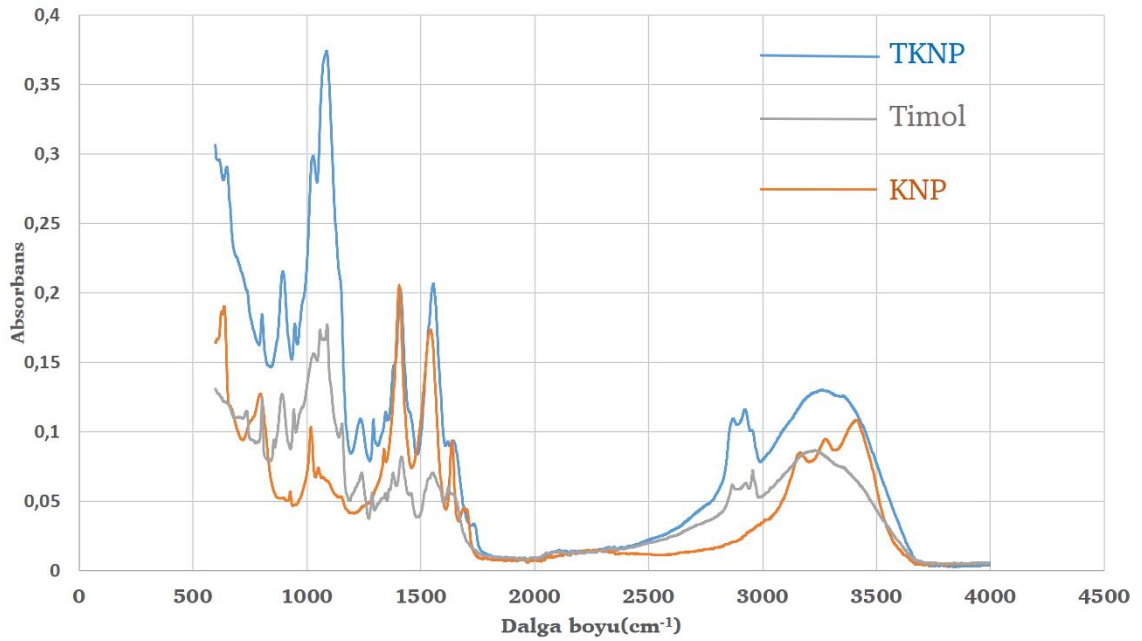
Şekil 4.23 pH 3 (asetat tampon çözeltisi) ortamında TKNP'lerin *in vitro* salım profili

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi, pH 7,4'tekine benzer şekilde ilk 6 saat içerisinde hızlı bir timol salımı gözlemlenmiştir ve bu sürede timolün % 52,2'si salınmıştır. 72. saate kadar gerçekleşen ikinci aşamada ise, % 62,6'a kadar ulaşan ve daha yavaş bir salım görülmüştür. Fosfat tamponu ile kıyaslandığında, asetat tampon çözeltisinde toplamda daha düşük bir miktarda salım meydana gelmiştir. Bunun nedeni, TKNP'lerin pH 3'te daha yüksek miktarda proton içermesi ve zetapotansiyel sıfırdan daha uzak bir değerde olmasından dolayı anyonik yapıya sahip timolün nanokapsül içerisinde oluşturduğu bağların salıma karşı gösterdiği dirençten kaynaklanmış olabilir.

Her iki pH değerinde salım profillerinin tam olmaması, KNP'lerinde tam bozulmaya ihtiyaç duyulduğuna işaret etmektedir [13].

4.4.6. FTIR ve RAMAN profili

FTIR, farklı örneklerin kimyasal yapısını karakterize etmek için kullanılan hızlı ve kullanışlı bir tekniktir. Bu çalışmada timol, KNP ve TKNP'lerin FTIR spektrumları ayrı ayrı analiz edilerek moleküler yapılarındaki farklılıklar irdelenmiştir. Her bir moleküle ait spektrumlar Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



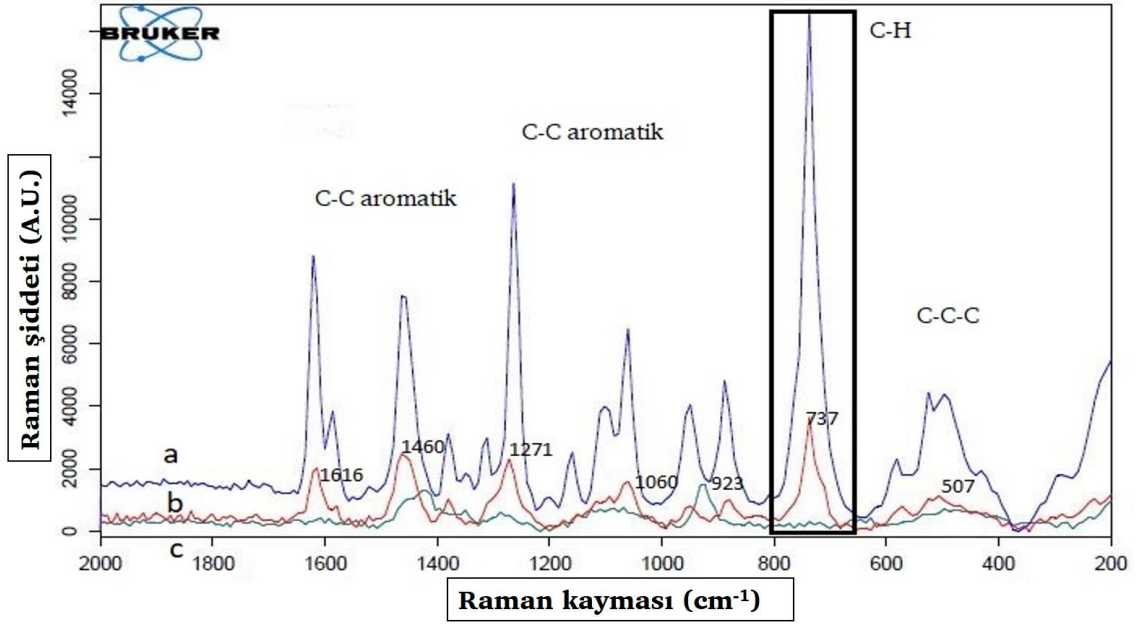
Şekil 4.24 TKNP, KNP ve timolün FTIR spektrumları

KNP'nin IR spektrumlarındaki ana pikler $3500-2900\text{ cm}^{-1}$ ve $1700-400\text{ cm}^{-1}$ olmak üzere iki bölgede ortaya çıkmıştır. Elde edilen pikler, Feyzioğlu ve Tornuk (2016) çalışmasındaki piklerle benzerdir [93]. KS içine TPP katılmasıyla, 3186 cm^{-1} tepe noktasındaki geniş bant, serbest, inter ve intra moleküler bağlı OH gruplarıyla ilişkili O-H germe titreşiminin bir sonucudur. Bu dalgaboyunda TKNP örneğinde bant genişlemesinin olması H bağının arttığını göstermektedir [118]. TKNP'nin FTIR spektrumunda 894 ve 1241 cm^{-1} 'de görülen pikler, KS-pentasodyum TPP bağlantısına (P=O grubu) atfedilmekte olup [130,137], 1636 cm^{-1} dalgaboyunda görülen pik ise asetillenmiş birimlerdeki ($-\text{CONH}_2$ grupları) C=O titreşimiyle oluşan karakteristik amid I bandını ifade etmektedir.

2,884 cm^{-1} 'de görülen pik C-H bağının gerilme titreşimine karşılık gelirken, 1,555 cm^{-1} 'deki bant güçlü bir amid III ($-\text{NH}_3$ grupları)'e atfedilmektedir [138]. 1300-800 cm^{-1} aralığındaki yoğun pik KS'nin TPP ile çapraz bağlanmasından sonra görülmekte olup, KNP'lerin yapısına katılan TPP'nin içerdiği fosfatın varlığını ifade etmektedir [103]. Bu piklerin varlığı nanopartikül oluşumunun bir göstergesi olup, KNP'lerde moleküler etkileşimlerin meydana geldiğini göstermektedir.

Yapılan birçok çalışmada, 3200-3500 cm^{-1} aralığındaki pik alanının genişlemesi ve yoğunluğunun artmasının nanopartiküllerde uçucu yağ varlığını ima ettiği bildirilmiştir [111,112,139,140]. Timol spektrumunda (Şekil 4.24) 3186 cm^{-1} de yer alan pikler, H bağı içeren fenolikte -OH gerilmesine karşılık gelen bir bandı göstermektedir. Timolün aromatik karakteri benzen halkasının C = C gerilmesi ile 1620 cm^{-1} 'de meydana gelen pik ile gösterilmektedir [141]. KNP'nin FTIR spektrumu ile karşılaştırıldığında, sisteme timol eklenmesi ile timol molekülünden gelebilecek ester gruplarının içeriğinde ve 2871-2957 cm^{-1} dalgaboyundaki C-H gerilme pikinin yoğunluğunda belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu bant, $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarında alifatik -CH gerilmesi ve metilen asimetric ve simetric gerilme titreşimi ile ilgilidir [142]. Bu nedenle, -CH grubunun gerilmesi ile pik tepe noktasının yükselmesi, timolün kapsüllemesinin bir sonucu olabilir. Bu sonuç, benzer çalışmalarda olduğu gibi timolün KS içerisinde iyonik jelasyon yöntemi ile nano ölçekte kapsüllenebileceğini göstermektedir [93,112].

Nanomalzemelerin özelliklerini karakterize etmek için Raman spektroskopisi de FTIR gibi yaygın olarak kullanılmaktadır [140]. Bu çalışmada, nanopartikül bileşenleri arasındaki moleküller arası etkileşimleri incelemek için TKNP'ler, timol içermeyen KNP'ler ve timolün Raman spektrumları elde edilmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

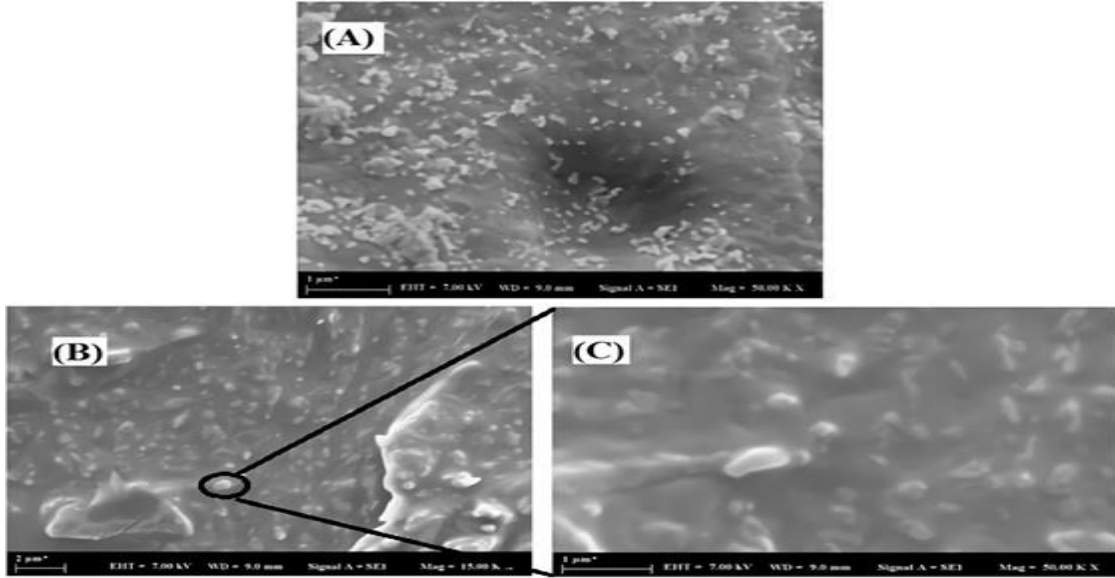


Şekil 4.25 (a) Timol, (b) TKNP ve (c) KNP'lerinin Raman spektrumları

KNP ve timolün tipik pikleri önceden bildirilmiştir [140–143], ancak literatürde TKNP'lerin Raman analizi üzerinde deneysel çalışma rapor edilmemiştir. Daferera ve ark. (2002) timolün FT-Raman spektrumunda 740 cm^{-1} 'de (halka titreşimi) karakteristik bir pik sergilediğini bildirmişlerdir [141]. Ren ve ark. (2014) Raman spektrumundaki KNP'lerin karakteristik piklerinden bazılarının halkaları gerdiren titreşime karşılık gelen 969 cm^{-1} (CH), 1212 cm^{-1} (CH) halka ve 1454 cm^{-1} (CH₃) olduğunu bildirmiştir [140]. Şekil 4.25 incelendiğinde, KNP'lerde bulunmayan timol karakteristik piki TKNP'lerde görülmektedir. Bu da kapsüllenen fonksiyonel timol bağlarının (C-H) bir göstergesi olabilir.

4.4.7. SEM

Optimize edilen koşullarda elde edilen timol yüklü ve yüklü olmayan KNP'lerin morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve örneklerle ait mikrograflar Şekil 4.26 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26 KNP'lerin (A) ve TKNP'lerin (B ve C) SEM görüntüleri

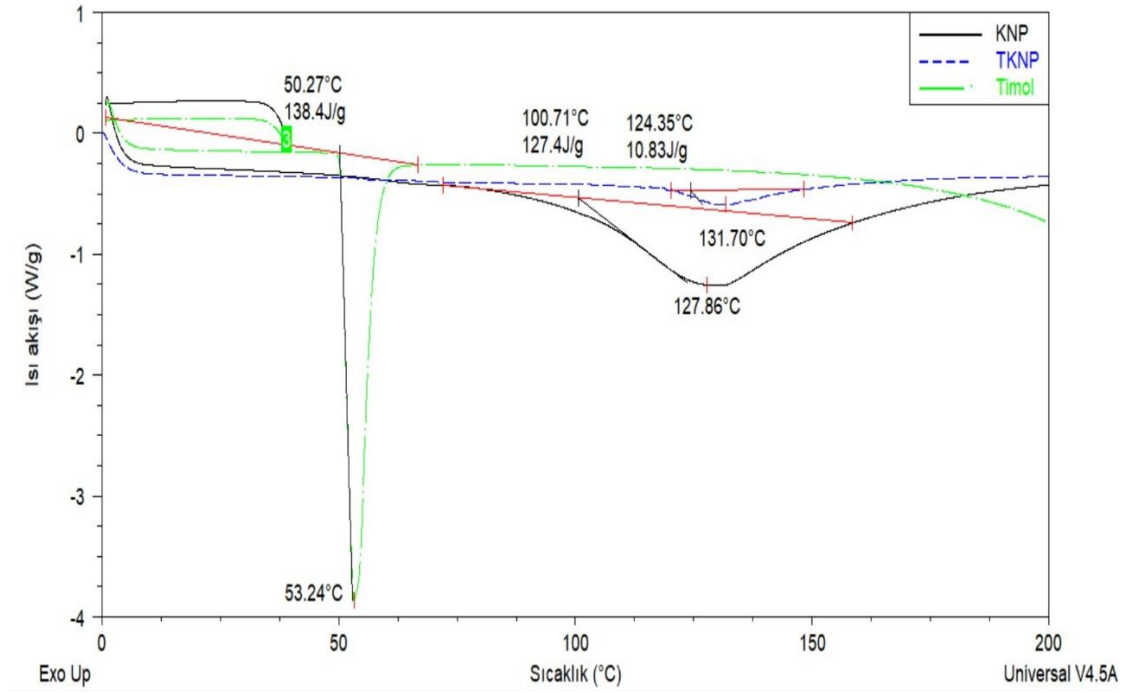
Partiküller ve arka plan arasında bir kontrast oluşturmak ve görüntü ölçeğini ayarlamak için ImageJ (National Institutes of Health) yazılımı kullanılmıştır. Bu işlemde, partiküllerin yuvarlak morfolojide oldukları varsayılarak otomatik hesaplama yapılmıştır.

Şekil 4.26 (A)'da, yaklaşık 150-250 nm çaplı KNP'lere ait nano ölçekli partiküller gösterilmiştir. TKNP'ler ise ortalama çapı 200-590 nm olan küresel bir şekil sergilemiştir (Şekil 4.26 (B)). Timolün dahil edilmesinden sonra nanopartiküllerin boyutunun büyüdüğü görülmektedir (Şekil 4.26 (C)).

Bu şekilde nanopartikül ölçümünün genişlemesi, timolün nanopartikül yüzeyinde birikimi ile tanımlanabilir [143]. TKNP'ler bazı bölgelerde kümeleşmeden ötürü daha şişkin formda görülmektedir. DLS yöntemiyle ölçülen boyutlarla SEM görüntüleri arasındaki boyut farklılığının liyofilizasyon işlemi sırasında örneklerin stabilitelerinedeki azalış ya da agregasyonundan kaynaklanabileceği düşünülebilir [93,144].

4.4.8. DSC

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), malzemelerin termal özelliklerinin araştırılmasında kullanılan yaygın bir tekniktir. DSC ile elde edilen ve KS ile kapsüllenmiş timol nanopartiküllerine ait termal analiz verileri, Şekil 4.27'de gösterilmiştir [140].



Şekil 4.27 Timol, KNP ve TKNP'lerin DSC termogramları

Şekil 4.27'de görüldüğü gibi, timolün termogramında yaklaşık 50 °C'de erime noktasına karşılık gelen bir endotermik pik görülmektedir [145]. Endotermik pik, KS eğrisinde 128° C' de iken, timol kapsüllenmiş örnekte 132 °C civarına kaymıştır. Bu sonuç, KNP'lere yüklenen timolün termal direncinde bir artış olduğunu göstermektedir.

Benzer bulgular, diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir [13,93,111]. Amiri ve ark. (2019) kimyon yüklü KNP'leri ürettikleri çalışmada, KS termogramda 91 °C sıcaklıkta bir endotermik pik ve 288 °C sıcaklıkta bir ekzotermik pik tespit etmiştir.

Bu alışmada, KS'nin hidrofilik grupları tarafından emilen su buharı ve yapı bozulması ile fosfat ve amin grupları arasındaki etkileşimlerden dolayı yer değişmelerin meydana geldiği ve KNP'lere kimyon yüklenmesiyle birlikte endotermik ve ekzotermik piklerin daha yüksek sıcaklık (105-109  C) aralığına kaydığı ifade edilmiştir[140]. Mezzomo ve ark. (2012) ise kapsüllenen ve kapsülleyen materyallerin bazı spesifik piklerin gözükmemesinin başarılı bir enkapsülasyonu gösterdiğini bildirmiştir [146].



Son zamanlarda nanoenkapsülasyon tekniği; kullanım kolaylığı, arttırılmış stabilite, oksidasyona karşı koruma, uçucu bileşenlerin tutulması, tat maskeleyme, kontrollü salım, ardışık çoklu bileşenlerin verilmesi, lezzet karakteri, uzun süreli organoleptik algı, toksik yan etkilerin azalması, hidrofobik bileşenlerin suda çözünürlüğünün arttırılması ve biyoyararlılık ve etkinliğin arttırılması gibi birçok avantajından dolayı farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, antimikrobiyal ve antioksidan ajanların etkinliklerini ve fonksiyonelliklerini geliştirmesinden dolayı gıda teknolojisi alanında nanoenkapsülasyona gittikçe daha büyük bir ilgi duyulmaktadır.

Bu çalışmada, kekik uçucu yağının majör bileşenlerinden birisi olan timolün iyonik jelasyon tekniği kullanılarak KS içerisinde başarılı bir şekilde nano ölçekte enkapsülasyonu sağlanmıştır. Çalışmada öncelikle iyonik jelasyon koşulları optimize edilmiş ve yüksek EE ve yüksek partikül stabilitesine sahip TKNP'ler üretilmiştir. Elde edilen TKNP'ler karakterize edilerek, TKNP'lerin gıda endüstrisi açısından önemli olduğu düşünülen birçok özelliği analiz edilmiştir. Bu çalışmada genel olarak aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- 1) KNP oluşumu için düşük partikül boyutu (nm) ve PDI değeri ile sıfırdan uzak zetapotansiyel (mV) değerini veren minimum ve maksimum KS (3 ve 6 mg/mL) ve TPP (0,15 ve 0,75 mg/mL) konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, KS konsantrasyonunun artması (TPP sabit) KNP boyutunu (nm) artırırken, TPP konsantrasyonunun artması (KS konsantrasyonu sabit) KNP boyutunda (nm) azalmaya neden olmuştur. KS konsantrasyonunun artması (TPP sabit) KNP zetapotansiyelini (mV) artırırken, TPP miktarının artması (KS konsantrasyonu sabit) zetapotansiyelinde (mV) azalmaya neden olmuştur.

TPP konsantrasyonu sabit tutulup, KS konsantrasyonu artırılırsa bu sefer de KNP'lerin PDI değerinin arttığı görülmektedir. KS konsantrasyonu sabit tutulup TPP konsantrasyonu artırıldığında ise PDI değeri azalmaktadır.

- 2) TKNP oluşumuna olası etkilerini belirlemek için timol (3-6 mg/mL), KS (3-6 mg/mL), TPP (0,15-0,75 mg/mL) ve T80 konsantrasyonu (3-6 mg/mL) ile iyonik jelasyon sırasında uygulanan sıcaklık (25-45  C) koşulları optimize edilmiştir. Optimizasyon için kısmi faktöriyel deneysel deneme tasarımı yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar EE (%), boyut (nm) ve zetapotansiyel (mV)  zerinden değerlendirilmiştir. Denemeler sonucunda optimum KS, timol, T80 ve TPP konsantrasyonları sırasıyla 3 mg/mL, 5,9 mg/mL, 3 mg/mL ve 0,75 mg/mL olarak tespit edilirken, optimum sıcaklık değeri 42  C olarak bulunmuştur. Bu formülasyonda elde edilen optimizasyon ile 338,2 nm boyut, 37 mV zetapotansiyel ve %67,8 EE değerlerine sahip TKNP'ler elde edilmiştir. Önerilen modeli doğrulamak için, optimize edilmiş formülasyon kullanılarak üç tekerrürlü deney gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde elde edilen TKNP'lerin partikül büyüklüğü $317,4 \pm 39,7$ nm, zetapotansiyel değeri $35,5 \pm 1,3$ mV ve EE % $64,1 \pm 3,16$ olarak bulunmuştur. Deneysel değerlerin model değerleri ile önemli ölçüde uyumlu olduğu belirlenmiştir.
- 3) Timol, KS, TPP, T80 konsantrasyonu ve sıcaklık derecesinin nanopartikül oluşumu sırasında EE (%), partikül boyutu (nm) ve zetapotansiyel (mV)  zerine olası etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; KS konsantrasyonun artması EE (%)'yi azaltırken, partikül boyutunda (nm) artışa neden olmuştur. KS konsantrasyonundaki artış zetapotansiyeli (mV) de artırmıştır. Timol konsantrasyonunun artması EE'yi artırırken, partikül boyutu (nm)  zerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. Zetapotansiyel değerinde (mV) ise artışa neden olmuştur. TPP konsantrasyonunun artması EE (%)'yi artırırken, KS konsantrasyonu 3 mg/mL olduğunda TPP konsantrasyonun artması boyutu azaltmakta, zetapotansiyel üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemektedir.

KS konsantrasyonu 3 mg/mL olduğunda, sıcaklığın artması partikül boyutunda kısmi bir azalışa neden olmuş, EE (%)’yi artırmış ancak zetapotansiyel üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye yol açmamıştır. T80 konsantrasyonunun artması ise partikül boyutunu (nm) artırmış, EE (%) ve zetapotansiyeli (mV) azaltmıştır. Buna göre; çekirdek materyalden daha yüksek oranda T80 kullanılması EE düşmektedir.

- 4) Üretim koşulları optimize edilen edilen TKNP’lerin EE’lerini doğrulamak için UV spektrofotometre ve GC-MS ile analizler yapılmıştır. Her iki yöntem ile tespit edilen EE değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur.
- 5) Bu çalışmada, KNP’ler içerisine biyoaktif bileşen olan timol etkin bir şekilde enkapsüle edilmiş ve TKNP üretim koşulları optimize edilmiştir.

Optimize edilen TKNP’lerin karakterizasyon işlemleri yapılmıştır ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- 1) Yüksek EE’ye, sıfırdan uzak zetapotansiyel değerine ve düşük partikül boyutuna sahip TKNP’ler elde edilmiştir. Elde edilen partiküllerin FTIR ve Raman Spektroskopisiyle moleküler yapısı karakterize edilmiştir. KNP’lere timol yüklenmesiyle birlikte yeni piklerin ortaya çıkması ve tepe yoğunluklarındaki artış, nanopartiküllerin oluşması ve moleküler etkileşimlerin olduğunu göstermiştir.
- 2) TKNP’lerin morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Timol eklenmesiyle nanopartiküllerin boyutu genişlemiş ve TKNP’ler 200-590 nm arasında küresel bir şekil göstermişlerdir.
- 3) TKNP’lerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal yakalama aktivitesi metoduyla incelenmiştir. TKNP’ler ve TKNP’lerin kapsüllediği miktardaki saf timolün antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında, kapsüllenme işlemiyle timolün antioksidan aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir.
- 4) TKNP’lerin test edilen dört bakteriyel suş üzerinde değişen oranlarda antibakteriyel etki gösterdikleri görülmüştür. TKNP’ler en yüksek ve en düşük etkiyi sırasıyla, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerinde göstermiştir. KNP’ler için ise bu durum tam tersi olarak bulunmuştur.

- 5) Sıvı besiyeri içerisinde yapılan antibakteriyel aktivite testlerinde, TKNP'ler konsantrasyonlarına bağlı olarak *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* üzerinde hiçbir aktif madde içermeyen kontrol örneklerine kıyasla yüksek antibakteriyel etki göstermişlerdir. *L. monocytogenes* için TKNP'lerin %2'lik (v/v) seviyesini içeren ortamlarda bakteri sayısı 24 saat sonunda sayılabilir düzeyin altında bulunmuştur.
- 6) TKNP ve KNP'lerin zetapotansiyel değerleri, farklı pH düzeylerinde incelenmiştir. Buna göre TKNP'nin PI'sinin pH 5, KNP'nın ise PI'sının pH 7 olduğu ve bu noktada bu nanopartiküllerin en düşük stabilite gösterdikleri tespit edilmiştir.

TKNP'lerin farklı pH değerlerinde *in vitro* salım profilleri incelenmiştir. PBS tampon çözeltisi (pH 7,4) ve Asetat tampon çözeltisi (pH 3) içerisinde timolün ilk 6 saatte hızlı bir şekilde salındığı, sonraki süreçte salımın yavaşlayarak devam ettiği gözlemlenmiştir. Asetat tampon çözeltisinde daha yavaş bir salım gerçekleşmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin belirlenen antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri gıda ürünlerinin raf ömrünün uzatılması, depolamanın iyileştirilmesini ve sağlık üzerine olası önemli etkileri, gıda bilimine önemli katkılarından sadece birkaçıdır. Özellikle gıda ürünlerinde kimyasal katkı maddeleri yerine alternatif olarak elde edilen antimikrobiyal ve antioksidan etkisi yüksek TKNP'ler kullanılabilir.

Nanoenkapsülasyon, timol gibi biyoaktif bileşikler ışık, hava ve nemden korumak için etkili bir yaklaşımdır. Çünkü bu etkileşimler, timolde oksidasyona veya buharlaşmaya, böylece de biyolojik aktivitesinin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca enkapsülasyon ile hidrofobik yapıdaki timolün suda çözünür hale gelmesi sağlanmıştır. Timolün kontrollü salımı kanıtlanmıştır. Kapsüllenmiş timol, gelişmiş antimikrobiyal ve antioksidan aktivite göstermiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada elde edilen nanopartiküller, sergiledikleri yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ile gıda ürünlerinin raf ömrünün uzatılması, fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi ve sağlığa daha faydalı hale getirilmesinde önemli rol oynama potansiyeline sahiptir.

Bu çalışma sonucunda, aşağıdaki önerilerde bulunulabilir:

1. TKNP'lerin farklı gıda sistemlerine ilavesi ile etkileri belirlenebilir. Özellikle bozulmaya meyilli doymamış yağlarca zengin gıdalar ve mikrobiyal açıdan kolay bozulabilen et ve et ürünleri seçilebilir.
2. TKNP'lerin insan sağlığı üzerindeki etkilerine ilişkin toksikolojik araştırmaların yapılması gerekmektedir.
3. TKNP'lerin sindirim sistemi üzerine etkisi ve biyoyararlılıkları ile ilgili çalışmaların yapılması tavsiye edilebilir.



-
- [1] S.M. Jafari, 1 - An overview of nanoencapsulation techniques and their classification, Elsevier Inc., 2017. doi:10.1016/B978-0-12-809436-5/00001-X.
 - [2] S. Defelice, The nutraceutical revolution : its impact on food industry R & D, (2000).
 - [3] S.M. Jafari, D.J. McClements, Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability, *Adv. Food Nutr. Res.* 81 (2017) 1–30. doi:10.1016/bs.afnr.2016.12.008.
 - [4] E. Shimoni, Nanotechnology for Foods: Delivery Systems, First Edit, Elsevier Inc., 2009. doi:10.1016/B978-0-12-374124-0.00023-5.
 - [5] S. Fuchs, M. Kutscher, T. Hertel, G. Winter, M. Pietzsch, C. Coester, Transglutaminase: New insights into gelatin nanoparticle cross-linking, *J. Microencapsul.* 27 (2010) 747–754. doi:10.3109/02652048.2010.518773.
 - [6] I. Katouzian, S.M. Jafari, Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins, *Trends Food Sci. Technol.* 53 (2016) 34–48. doi:10.1016/j.tifs.2016.05.002.
 - [7] S.H. Mirdehghan, D. Valero, Bioactive compounds in tomato fruit and its antioxidant activity as affected by incorporation of Aloe, eugenol, and thymol in fruit package during storage, *Int. J. Food Prop.* 20 (2017) 1798–1806. doi:10.1080/10942912.2016.1223128.
 - [8] E. Medina, N. Caro, L. Abugoch, A. Gamboa, M. Díaz-Dosque, C. Tapia, Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films, *J. Food Eng.* 240 (2019) 191–198. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.07.023.
 - [9] M. Llana-Ruiz-Cabello, S. Pichardo, S. Maisanaba, M. Puerto, A.I. Prieto, D. Gutiérrez-Praena, A. Jos, A.M. Cameán, In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review, *Food Chem. Toxicol.* 81 (2015) 9–27. doi:10.1016/j.fct.2015.03.030.
 - [10] G. Klein, C. Rüben, M. Upmann, Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms, *Curr. Microbiol.* 67 (2013) 200–208. doi:10.1007/s00284-013-0354-1.
 - [11] M.S. Brewer, Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10 (2011) 221–247. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.

- [12] M. Kfoury, D. Landy, S. Ruellan, L. Auezova, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Determination of formation constants and structural characterization of cyclodextrin inclusion complexes with two phenolic isomers: Carvacrol and thymol, *Beilstein J. Org. Chem.* 12 (2016) 29–42. doi:10.3762/bjoc.12.5.
- [13] L. Keawchaoon, R. Yoksan, Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles, *Elsevier B.V.*, 2011. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.12.031.
- [14] P.R. Quiroga, C.M. Asensio, V. Nepote, Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds, *J. Sci. Food Agric.* 95 (2014) 471–479. doi:10.1002/jsfa.6744.
- [15] K. Pan, H. Chen, P.M. Davidson, Q. Zhong, Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: Physical and antilisterial properties, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1649–1657. doi:10.1021/jf4055402.
- [16] Z.Q. Su, H.L. Zhang, S.H. Wu, Y. Tao, L.Q. Zang, Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system, *J. Nanomater.* 2010 (2010). doi:10.1155/2010/898910.
- [17] A. Shetta, J. Kegere, W. Mamdouh, Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities, *Elsevier B.V.*, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.161.
- [18] F. Chen, Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles, *Biotechnol. Bioeng.* 104 (2009) 30–39. doi:10.1002/bit.22363.
- [19] A. Rezaei, M. Fathi, S.M. Jafari, Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers, *Food Hydrocoll.* 88 (2019) 146–162. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.10.003.
- [20] A. Mohammadi, M. Hashemi, S.M. Hosseini, Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease, 2015. doi:10.1016/j.ifset.2014.12.011.
- [21] M. Ghaderi-Ghahfarokhi, M. Barzegar, M.A. Sahari, M.H. Azizi, Nanoencapsulation Approach to Improve Antimicrobial and Antioxidant Activity of Thyme Essential Oil in Beef Burgers During Refrigerated Storage, *Food Bioprocess Technol.* 9 (2016) 1187–1201. doi:10.1007/s11947-016-1708-z.
- [22] J.S. Lee, G.H. Kim, H.G. Lee, Characteristics and antioxidant activity of *elsholtzia splendens* extract-loaded nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3316–3321. doi:10.1021/jf904091d.

- [23] Z. Ceylan, G.F. Unal Sengor, M.T. Yilmaz, Nanoencapsulation of liquid smoke/thymol combination in chitosan nanofibers to delay microbiological spoilage of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets, *J. Food Eng.* 229 (2018) 43–49. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.11.038.
- [24] A. Celebioglu, Z.I. Yildiz, T. Uyar, Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: Enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol, *Food Res. Int.* 106 (2018) 280–290. doi:10.1016/j.foodres.2017.12.062.
- [25] Z. Aytac, S. Ipek, E. Durgun, T. Tekinay, T. Uyar, Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol / cyclodextrin-inclusion complex for food packaging, *Food Chem.* 233 (2017) 117–124. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.095.
- [26] W. Ajun, S. Yan, G. Li, L. Huili, Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study, *Carbohydr.Polym.* 75 (2009) 566–574. doi:10.1016/j.carbpol.2008.08.019.
- [27] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, 1997. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1
- [28] A.L. de Pinho Neves, C.C. Milioli, L. Müller, H.G. Riella, N.C. Kuhn, H.K. Stulzer, Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 445 (2014) 34–39. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.12.058.
- [29] B. Shah, D. Khunt, M. Misra, H. Padh, "Application of Box-Behnken design for optimization and development of quetiapine fumarate loaded chitosan nanoparticles for brain delivery via intranasal route ", *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 206–218. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.076.
- [30] H. Elmizadeh, M. Khanmohammadi, K. Ghasemi, G. Hassanzadeh, M. Nassiri-Asl, A.B. Garmarudi, Preparation and optimization of chitosan nanoparticles and magnetic chitosan nanoparticles as delivery systems using Box-Behnken statistical design, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 80 (2013) 141–146. doi:10.1016/j.jpba.2013.02.038.
- [31] C.P. Kiilll, H. da S. Barud, S.H. Santagneli, S.J.L. Ribeiro, A.M. Silva, A. Tercjak, J. Gutierrez, A.M. Pironi, M.P.D. Gremião, Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1695–1702. doi:10.1016/j.carbpol.2016.11.053.
- [32] S. Liu, P.C. Ho, Formulation optimization of scutellarin-loaded HP- β -CD/chitosan nanoparticles using response surface methodology with Box–Behnken design, *Asian J. Pharm. Sci.* 12 (2017) 378–385. doi:10.1016/j.ajps.2017.04.003.

- [33] M. Sharma, R. Sharma, D.K. Jain, A. Saraf, Enhancement of oral bioavailability of poorly water soluble carvedilol by chitosan nanoparticles: Optimization and pharmacokinetic study, *Int. J. Biol. Macromol.* 135 (2019) 246–260. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.162.
- [34] S.M. Abdel-Hafez, R.M. Hathout, O.A. Sammour, Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs, *Int. J. Biol. Macromol.* 64 (2014) 334–340. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.11.041.
- [35] R.H. Müller, C.M. Keck, Second generation of drug nanocrystals for delivery of poorly soluble drugs: smartCrystal technology, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) S20–S21. doi:10.1016/j.ejps.2008.02.049.
- [36] E.S. Committee, Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain, *EFSA J.* 9 (2011) 1–36. doi:10.2903/j.efsa.2011.2140.
- [37] C. Anandharamakrishnan, *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*, 2014. doi:10.1007/978-1-4614-9387-7.
- [38] Q. Huang, H. Yu, Q. Ru, Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology, *J. Food Sci.* 75 (2010). doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x.
- [39] D.J. McClements, E.A. Decker, Y. Park, J. Weiss, Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods, 2009. doi:10.1080/10408390902841529.
- [40] H.D. Silva, M.Â. Cerqueira, A.A. Vicente, Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization, *Food Bioprocess Technol.* 5 (2012) 854–867. doi:10.1007/s11947-011-0683-7.
- [41] S.M. Jafari, *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*, 2017. <https://www.elsevier.com/books/nanoencapsulation-of-food-bioactive-ingredients/jafari/978-0-12-809740-3>.
- [42] S. Akhavan, E. Assadpour, I. Katouzian, S.M. Jafari, Lipid nano scale cargos for the protection and delivery of food bioactive ingredients and nutraceuticals, *Trends Food Sci. Technol.* 74 (2018) 132–146. doi:10.1016/j.tifs.2018.02.001.
- [43] P.N. Ezhilarasi, P. Karthik, N. Chhanwal, Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review, (2013) 628–647. doi:10.1007/s11947-012-0944-0.
- [44] V. Nedovic, A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic, B. Bugarski, An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Sci.* 1 (2011) 1806–1815. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- [45] N.J. Zuidam, E. Shimoni, Overview of microencapsulates for use in food products and processes, *Encapsulation Technol. Act. Food Ingredients Food Process.* (2010) 3–29. doi:10.1007/978-1-4419-1008-0_2.

- [46] H. Barbosa-Canovás, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, Encapsulation processes, in: Coating, Kluwer Academic/Plenum, New York, 2005: pp. 199–200.
- [47] İ. Tontul, Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology Nanoencapsulation Techniques in Food Industry, 7 (2019) 220–233.
- [48] S.A. Mahdavi, S.M. Jafari, M. Ghorbani, E. Assadpoor, Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review, Dry. Technol. 32 (2014) 509–518. doi:10.1080/07373937.2013.839562.
- [49] A.R. Khare, N. Vasisht, Nanoencapsulation in the Food Industry: Technology of the Future, Elsevier Inc., 2014. doi:10.1016/B978-0-12-404568-2.00014-5.
- [50] P. Sanguansri, M.A. Augustin, Nanoscale materials development - a food industry perspective, Trends Food Sci. Technol. 17 (2006) 547–556. doi:10.1016/j.tifs.2006.04.010.
- [51] A. Matalanis, O.G. Jones, D.J. McClements, Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds, Food Hydrocoll. 25 (2011) 1865–1880. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.04.014.
- [52] L. Sagalowicz, M.E. Leser, Delivery systems for liquid food products, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 15 (2010) 61–72. doi:10.1016/j.cocis.2009.12.003.
- [53] A. López-Rubio, J.M. Lagaron, Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 13 (2012) 200–206. doi:10.1016/j.ifset.2011.10.012.
- [54] L. Chen, G.E. Remondetto, M. Subirade, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, Trends Food Sci. Technol. 17 (2006) 272–283. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.011.
- [55] C. Blasco, Y. Picó, Determining nanomaterials in food, TrAC - Trends Anal. Chem. 30 (2011) 84–99. doi:10.1016/j.trac.2010.08.010.
- [56] C.F. Chau, S.H. Wu, G.C. Yen, The development of regulations for food nanotechnology, Trends Food Sci. Technol. 18 (2007) 269–280. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.007.
- [57] S. Neethirajan, D.S. Jayas, Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries, Food Bioprocess Technol. 4 (2011) 39–47. doi:10.1007/s11947-010-0328-2.
- [58] C.M. Sabliov, C.E. Astete, Encapsulation and controlled release of antioxidants and vitamins, Deliv. Control. Release Bioact. Foods Nutraceuticals. (2008) 297–330. doi:10.1533/9781845694210.3.297.

- [59] V.K. Bajpai, M. Kamle, S. Shukla, D.K. Mahato, P. Chandra, S.K. Hwang, P. Kumar, Y.S. Huh, Y.K. Han, Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security, *J. Food Drug Anal.* 26 (2018) 1201–1214. doi:10.1016/j.jfda.2018.06.011.
- [60] M.T. Bazana, C.F. Codevilla, C.R. de Menezes, Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives, *Curr. Opin. Food Sci.* 26 (2019) 47–56. doi:10.1016/j.cofs.2019.03.005.
- [61] D.J. McClements, L. Bai, C. Chung, Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions, (2017) 1–32. doi:10.1146/annurev-food-030216-030154.
- [62] A.M. Pisoschi, A. Pop, C. Cimpeanu, V. Turcuş, G. Predoi, F. Iordache, Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view, *Eur. J. Med. Chem.* 157 (2018) 1326–1345. doi:10.1016/j.ejmech.2018.08.076.
- [63] S.M. Jafari, E. Assadpour, Nanoencapsulation: Techniques and Developments for Food Applications, in: A. López-Rubio (Ed.), *Nanomater. FOOD Appl.*, 2019: p. 446. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00003-8.
- [64] V. Suganya, V. Anuradha, Microencapsulation and Nanoencapsulation : A Review, 9 (2017) 233–239. doi:10.25258/ijpcr.v9i3.8324.
- [65] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 90 (2012) 21–27. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.
- [66] S. Woranuch, R. Yoksan, Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation, 2013. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.117.
- [67] N. Hasheminejad, F. Khodaiyan, M. Safari, Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles, Elsevier, 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.085.
- [68] V. Arulmozhi, K. Pandian, S. Mirunalini, Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB), *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 110 (2013) 313–320. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.039.
- [69] I. Nallamuthu, A. Devi, F. Khanum, Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability, *Asian J. Pharm. Sci.* 10 (2014) 203–211. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.005.
- [70] S. Chatterjee, M. Adhya, A.K. Guha, B.P. Chatterjee, Chitosan from *Mucor rouxii*: Production and physico-chemical characterization, *Process Biochem.* 40 (2005) 395–400. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.025.

- [71] M. Huang, E. Khor, L.Y. Lim, Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation, *Pharm. Res.* 21 (2004) 344–353. doi:10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5.
- [72] D.S. Bodas, P.P. Ige, Central composite rotatable design for optimization of budesonide-loaded cross-linked chitosan–dextran sulfate nanodispersion: characterization, in vitro diffusion and aerodynamic study, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 45 (2019) 1193–1204. doi:10.1080/03639045.2019.1606823.
- [73] K.D.M.S. Jisha, Chitosan nanoparticles preparation and applications, *Environ. Chem. Lett.* (2017). doi:10.1007/s10311-017-0670-y.
- [74] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1358–1368. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.
- [75] G. Kerch, Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 46 (2015) 159–166. doi:10.1016/j.tifs.2015.10.010.
- [76] K.K. Li, S.W. Yin, X.Q. Yang, C.H. Tang, Z.H. Wei, Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (SC) nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 11592–11600. doi:10.1021/jf302752v.
- [77] H.M.C. Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 313–326. doi:10.1002/ffj.2019.
- [78] Ž.R. Lazić, Design of experiments in chemical engineering: a practical guide, Book, 2004. <http://books.google.com/books?id=79JTAAAMAAJ&pgis=1>.
- [79] R.A. Olivero, J.M. Nocerino, S.N. Deming, Experimental Design and Optimization, *Handb. Environ. Chem.* 2 (1995) 73–122. doi:10.1007/978-3-540-49148-4-3.
- [80] M.D. Turan, H.S. Altundoğan, Use of response surface methods in hydrometallurgical researches, *Madencilik.* 50 (2011) 11–23.
- [81] N.C. İçyer, Bitkisel yağlarda ağartma prosesinin ultrasonik sistemin entegrasyonu ile geliştirilmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2018.
- [82] Raymond H. M. Douglas C. M., Christine M. A., Response Surface Methodology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada, 2009.
- [83] R. Shaw, M.F.W. Festing, I. Peers, L. Furlong, Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use, *ILAR J.* 43 (2002) 223–232. doi:10.1093/ilar.43.4.223.
- [84] T. Şahan, D. Öztürk, Investigation of Pb(II) adsorption onto pumice samples: Application of optimization method based on fractional factorial design and response surface methodology, *Clean Technol. Environ. Policy.* 16 (2014) 819–831. doi:10.1007/s10098-013-0673-8.

- [85] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, John-Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013.
- [86] D.J. Sullivan, M. Cruz-Romero, T. Collins, E. Cummins, J.P. Kerry, M.A. Morris, Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles, Food Hydrocoll. 83 (2018) 355–364. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.05.010.
- [87] V. Saharan, A. Mehrotra, R. Khatik, P. Rawal, S.S. Sharma, A. Pal, Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi., Springer International Publishing, 2013. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012.
- [88] R.A. Hashad, R.A.H. Ishak, S. Fahmy, S. Mansour, A.S. Geneidi, Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks, Elsevier B.V., 2016. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.042.
- [89] G.S. Bangale, G. V Shinde, R. Ks, Formulation and Optimization of Nanoparticale by 3 2 Factorial Design for Colon Targeting, 7 (2019). doi:10.19080/GJPPS.2019.07.555702.
- [90] M.X. Quintanilla-Carvajal, B.H. Camacho-Díaz, L.S. Meraz-Torres, J.J. Chanona-Pérez, L. Alamilla-Beltrán, A. Jiménez-Aparicio, G.F. Gutiérrez-López, Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing, Food Eng. Rev. 2 (2010) 39–50. doi:10.1007/s12393-009-9012-6.
- [91] U. Nobbmann, M. Connah, B. Fish, P. Varley, C. Gee, S. Mulet, J. Chen, L. Zhou, Y. Lu, F. Sheng, J. Yi, S.E. Harding, Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 24 (2007) 117–128. doi:10.1080/02648725.2007.10648095.
- [92] Y. Gökçe, Kitosan nanoparçacıklarının sentezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- [93] G.C. Feyzioglu, F. Tornuk, Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications, LWT - Food Sci. Technol. 70 (2016) 104–110. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.037.
- [94] J. Hu, Y. Zhang, Z. Xiao, X. Wang, Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules, 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.058.
- [95] H. Cui, M. Bai, M.M.A. Rashed, L. Lin, The antibacterial activity of clove oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers against Escherichia coli O157:H7 biofilms on cucumber., Int. J. Food Microbiol. 266 (2018) 69–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.019.

- [96] J. Wu, Q. Shu, Y. Niu, Y. Jiao, Q. Chen, Preparation, Characterization, and Antibacterial Effects of Chitosan Nanoparticles Embedded with Essential Oils Synthesized in an Ionic Liquid Containing System, 2018. doi:10.1021/acs.jafc.8b01428.
- [97] M.M. Poojary, K.A. Vishnumurthy, A. Vasudeva Adhikari, Extraction, characterization and biological studies of phytochemicals from *Mammea suriga*, *J. Pharm. Anal.* 5 (2015) 182–189. doi:10.1016/j.jpha.2015.01.002.
- [98] Z.K. Emiroğlu, G.P. Yemiş, B.K. Coşkun, K. Candoğan, Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties, *Meat Sci.* 86 (2010) 283–288. doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.016.
- [99] F. Tornuk, O. Sagdic, M. Hancer, H. Yetim, Development of LLDPE based active nanocomposite films with nanoclays impregnated with volatile compounds, *Food Res. Int.* 107 (2018) 337–345. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.036.
- [100] S.M. Hosseini, H. Hosseini, M.A. Mohammadifar, A.M. Mortazavian, A. Mohammadi, K. Khosravi-Darani, S. Shojaee-Aliabadi, S. Dehghan, R. Khaksar, Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process, Elsevier B.V., 2013. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054.
- [101] S. Rahaiee, S.A. Shojaosadati, M. Hashemi, S. Moini, S.H. Razavi, Improvement of crocin stability by biodegradable nanoparticles of chitosan-alginate, *Int. J. Biol. Macromol.* (2015). doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.041.
- [102] K.A.M. O’Callaghan, J.P. Kerry, Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, Including cheese-derived cultures, *Food Control.* 69 (2016) 256–261. doi:10.1016/j.foodcont.2016.05.005.
- [103] Y. Gokce, B. Cengiz, N. Yildiz, A. Calimli, Z. Aktas, Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 462 (2014) 75–81. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.08.028.
- [104] V.J. Mohanraj, Y. Chen, Nanoparticles - A review, *Trop. J. Pharm. Res.* 5 (2007) 561–573. doi:10.4314/tjpr.v5i1.14634.
- [105] C. Bulmer, A. Margaritis, A. Xenocostas, Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin, *Biochem. Eng. J.* 68 (2012) 61–69. doi:10.1016/j.bej.2012.07.007.
- [106] L. Zhang, S.L. Kosaraju, Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 2956–2966. doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033.

- [107] A. Mohammadi, M. Hashemi, S.M. Hosseini, Chitosan nanoparticles loaded with *Cinnamomum zeylanicum* essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage, Elsevier B.V., 2015. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.08.019.
- [108] Y. Huang, Y. Lapitsky, Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels, *Langmuir*. 27 (2011) 10392–10399. doi:10.1021/la201194a.
- [109] N. Rathi, V.G. Gaikar, Optimization of Continuous Synthesis of Cross-Linked Chitosan Nanoparticles Using Microreactors, *Chem. Eng. Technol.* 40 (2017) 506–513. doi:10.1002/ceat.201600339.
- [110] S.F. Hosseini, M. Rezaei, M. Zandi, F. Farahmandghavi, Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles-Loaded Fish Gelatin-Based Edible Films, 2016. doi:10.1111/jfpe.12246.
- [111] A. Esmaeili, A. Asgari, In vitro release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 283–290. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.010.
- [112] S.F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi, Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study, Elsevier Ltd., 2013. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.031.
- [113] Z. Ahmadi, M. Saber, A. Akbari, G.R. Mahdavinia, Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161 (2018) 111–119. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.05.051.
- [114] J. Haider, H. Majeed, P.A. Williams, W. Safdar, F. Zhong, Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement, Elsevier Ltd, 2017. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.08.020.
- [115] M. Ghaderi Ghahfarokhi, M. Barzegar, M.A. Sahari, M.H. Azizi, Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in Chitosan Nanoparticles, 2016.
- [116] K.D. Martínez, A.M.R. Pilosof, Relative viscoelasticity of soy protein hydrolysate and polysaccharides mixtures at cooling conditions analyzed by response surface methodology, *Food Hydrocoll.* 26 (2012) 318–322. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.04.019.
- [117] A. Jain, K. Thakur, G. Sharma, P. Kush, U.K. Jain, Fabrication, characterization and cytotoxicity studies of ionically cross-linked docetaxel loaded chitosan nanoparticles, Elsevier Ltd., 2016. doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.012.

- [118] J. Antoniou, F. Liu, H. Majeed, J. Qi, W. Yokoyama, F. Zhong, Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles, Elsevier B.V., 2015. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.10.040.
- [119] T. Chuacharoen, S. Prasongsuk, C.M. Sabliov, Effect of surfactant concentrations on physicochemical properties and functionality of curcumin nanoemulsions under conditions relevant to commercial utilization, *Molecules*. 24 (2019) 1–12. doi:10.3390/molecules24152744.
- [120] N.S. Pharm, D.K. Ph.D., N.S. Pharm., Optimization of Formulation Parameters and Characterization of Simvastatin Loaded Chitosan Nanoparticles., *Int. J. Adv. Res.* 5(2017) 2386–2400. doi:10.21474/ijar01/3422.
- [121] K. Çınar, A review on nanoemulsion: Preparation methods and stability, *Trak. Üniversitesi Mühendislik Bilim. Derg.* 18 (2017) 73–83.
- [122] Akkaya Arıer Ü. Ö., Nano brukit tio2 ve tio2 nanokompozit filmlerin üretimi ve karakterizasyonu, İstanbul Teknik Üniversitesi, Doktora Tezi, 2011.
- [123] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 44 (2005) 65–73. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.06.001.
- [124] H. Liu, C. Gao, Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles, *Polym. Adv. Technol.* 20 (2009) 613–619. doi:10.1002/pat.1306.
- [125] Q. Gan, T. Wang, Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 59 (2007) 24–34. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.04.009.
- [126] C. Nanoparticles, R. Asasutjarit, C. Sorrachaitawatwong, N. Tipchuwong, S. Pouthai, Effect of Formulation Compositions on Particle Size and Zeta Potential of Diclofenac Sodium-Loaded, *Int J Med Heal. Biomed Bioorg Pharm Eng.* 7 (2013) 309–311.
- [127] N.C. İçyer, Nar kabuğu fenolik bileşiklerinin su ile ekstraksiyonu ve ekstraktların mikrokapsülasyonu, Erciyes Üniversitesi, Tez, 2012.
- [128] E.N. Koukaras, S.A. Papadimitriou, D.N. Bikiaris, G.E. Froudakis, Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2856–2862. doi:10.1021/mp300162j.
- [129] K. Tiede, A.B.A. Boxall, S.P. Tear, J. Lewis, H. David, M. Hassellöv, Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25 (2008) 795–821. doi:10.1080/02652030802007553.

- [130] R.D. Bhumkar, V.B. Pokharkar, Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, AAPS PharmSciTech. 7 (2006) 1–7. doi:10.1208/pt070250.
- [131] S. Das, V.K. Singh, A.K. Dwivedy, A.K. Chaudhari, N. Upadhyay, P. Singh, S. Sharma, N.K. Dubey, Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of *Coriandrum sativum* essential oil, Int. J. Biol. Macromol. 133 (2019) 294–305. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.070.
- [132] K. Divya, S. Vijayan, T.K. George, M.S. Jisha, Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles : Mode of Action and Factors Affecting Activity, 18 (2017) 221–230. doi:10.1007/s12221-017-6690-1.
- [133] M. Hosseinnajad, S.M. Jafari, Running Title : Antimicrobial properties of chitosan, Int.J.Biol.Macromol. (2016). doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
- [134] G.I. Kh, M.A. Abdel, S.A.M. Abdelgaleil, Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi, Pestic. Biochem. Physiol. 103 (2012) 56–61. doi:10.1016/j.pestbp.2012.03.004.
- [135] K.V. Jardim, G.A. Joanitti, R.B. Azevedo, A.L. Parize, Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles, Mater. Sci. Eng. C. 56 (2015) 294–304. doi:10.1016/j.msec.2015.06.036.
- [136] J. Je, S. Kim, Reactive oxygen species scavenging activity of aminoderivatized chitosan with different degree of deacetylation, 14 (2006) 5989–5994. doi:10.1016/j.bmc.2006.05.016.
- [137] P. Severino, C.F. da Silva, M.A. da Silva, M.H.A. Santana, E.B. Souto, Chitosan Cross-Linked Pentasodium Tripolyphosphate Micro/Nanoparticles Produced by Ionotropic Gelation, Sugar Tech. 18 (2016) 49–54. doi:10.1007/s12355-014-0360-z.
- [138] J. Grant, J. Cho, C. Allen, Self-assembly and physicochemical and rheological properties of a polysaccharide-surfactant system formed from the cationic biopolymer chitosan and nonionic sorbitan esters, Langmuir. 22 (2006) 4327–4335. doi:10.1021/la060017g.
- [139] S. Kundu, U. Nithiyanantham, In situ formation of curcumin stabilized shape-selective Ag nanostructures in aqueous solution and their pronounced SERS activity, RSC Adv. 3 (2013) 25278–25290. doi:10.1039/c3ra44471f.
- [140] R.E.K. Amir Amiri, Alireza Mousakhani-Ganjeh, Zohreh Amiri, Yi-gong Guo, Anubhav Pratap Singh, Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system, Food Chem. (2019) 125821. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125821.

- [141] Z. Zamani, D. Alipour, H.R. Moghimi, S.A.R. Mortazavi, M. Saffary, Development and evaluation of thymol microparticles using cellulose derivatives as controlled release dosage form, Iran. J. Pharm. Res. 14 (2015) 1031–1040. doi:10.22037/ijpr.2015.1754.
- [142] M.E. Sotelo-Boyás, Z.N. Correa-Pacheco, S. Bautista-Baños, M.L. Corona-Rangel, Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens, 2017. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.022.
- [143] D. Kavaz, M. Idris, C. Onyebuchi, Physicochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with *Cyperus articulatus rhizome* essential oils, Int. J. Biol. Macromol. 123 (2019) 837–845. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.177.
- [144] F.O.M.S. Abreu, E.F. Oliveira, H.C.B. Paula, R.C.M. De Paula, Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation, Carbohydr. Polym. 89 (2012) 1277–1282. doi:10.1016/j.carbpol.2012.04.048.
- [145] P.A. Ponce Cevallos, M.P. Buera, B.E. Elizalde, Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability, J. Food Eng. 99 (2010) 70–75. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039.
- [146] N. Mezzomo, E. De Paz, M. Maraschin, Á. Martín, M.J. Cocero, S.R.S. Ferreira, Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency, J. Supercrit. Fluids. 66 (2012) 342–349. doi:10.1016/j.supflu.2011.08.006.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: m.ali.cakir@klu.edu.tr

Makale

1. M.A. Çakır, N.C. İcyer, F. Tornuk, International Journal of Biological Macromolecules Optimization of production parameters for fabrication of thymol-loaded chitosan nanoparticles, 151 (2020) 230–238. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.096

