



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ÇINAR AĞACI (PLATANUS OREINTALIS) POLENİNDEN
ELDE EDİLEN MİKRO KAPSÜLLERE PARASETAMOL
YÜKLENMESİ VE SALINIM ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammad Mujtaba

DANIŞMAN

Doç. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2016



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ÇINAR AĞACI (PLATANUS OREINTALIS) POLENİNDEN
ELDE EDİLEN MİKRO KAPSÜLLERE PARASETAMOL
YÜKLENMESİ VE SALINIM ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammad Mujtaba

DANIŞMAN

Doç. Dr. Murat KAYA

AKSARAY, 2016

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330803 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, "MUHAMMAD MUJTABA", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "ÇINAR AĞACI (*PLATANUS OREINTALIS*) POLENİNDEN ELDE EDİLEN MİKRO KAPSÜLLERE PARASETAMOL YÜKLENMESİ VE SALINIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Murat KAYA**
Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR**
Ankara Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**
Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi: 13 Aralık 2016

Savunma Tarihi: 03 Ocak 2017

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanıştımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım. Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Muhammad Mujtaba

ÖNSÖZ

Daha önce yapılan çalışmalarda polenlerden elde edilen sporopolenlerin ilaç salınımı için alternatif bir mikro-taşıyıcı olarak kullanılabilceği belirlenmiştir. Sporopolenlerin sahip olduğu, termal stabilite, antioksidan özellik, kimyasal ve biyolojik ajanlara karşı dayanıklılık ile boyut dağılımındaki homojenite ve gözenekli yüzey morfoloji gibi özellikler onları ilaç yükleme için elverişli bir materyal yapmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ilaç salınımında sporopolenlerin diğer mikro-taşıyıcı materyallere göre üstünlüğünü ortaya koymuştur.

Bu çalışmada ise ilk kez *Platanus orientalis* polenlerinden sporopolen mikrokafes üretimi gerçekleştirilmiştir. *P. orientalis* polenleri Kastamonu'dan 24.04.2013 tarihinde toplanmıştır. Elde edilen mikrokafesler, iki farklı metod (pasif yükleme tekniği ve evaporator ile yükleme tekniği) kullanılarak parasetamol ile yüklenmiş ve kontrollü salınımları gerçekleştirilmiştir. Boş ve ilaç yüklü sporopolenlerin fiziko-kimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Analiz sonuçlarında, sporopolenlerin yüksek termal kararlılığa ve porlu yüzey yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, evaporator ile yükleme tekniği kullanılarak sporopolenlere pasif yükleme tekniğinden daha yüksek oranda ilaç yüklendiği analiz sonuçları ile kanıtlanmıştır. İlaç yüklü sporopolenlerin invitro koşullarda (yapay mide ve bağırsak ortamı) kontrollü salınımı için uygun bir taşıyıcı olabileceği saptanmıştır.

Bu tez çalışması Aksaray Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Genel Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Ayrıca bu tez, TÜBİTAK 2215-Uluslararası Öğrenciler için Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Aydınlığın ışığı, bilginin kaynağı, barışın elçisi olan insanlığın en büyük hayır kurucusu olan ve şimdiye kadar insanlığa rehberlik eden meşale olan Peygamberimiz (sav.) için minnettarım ve sayısız selamlarımı sunuyorum.

TÜBİTAK 2215 - Uluslararası Öğrenciler için Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bu çalışmanın desteklenmesinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans çalışmalarım, bu teze farklı şekillerde destek veren pek çok kişinin yardımı olmadan mümkün olmazdı. Onlara, içten teşekkürlerimi ve samimi takdirimi iletmek isterim.

Beni Yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden ve bilimsel çalışmalarımda rehberlik eden kıymetli danışmanım Doç. Dr. Murat KAYA'ya içten teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam sırasında bana çok yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Lalehan AKYÜZ'e ve Dr. İdris SARGIN'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, ihtiyaç duyduğumda her zaman yanımda olan aileme, arkadaşlarım Ayşe GÜNYAKTI, Esra BULUT, Bahar AKYÜZ, Ivan-Aljaff, Karwan SOFI ve Behlül KOÇ'a teşekkür ederim.

Beni büyüten ve bugünlerime getiren anneme (Khurshida) ve müteveffa babama (Faqir Muhammad) minnettarım, onlar her zaman kalbimde ve dualarımda.

Muhammad Mujtaba

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
DOĞRULUK BEYANI	iv
ÖNSÖZ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Terminoloji.....	3
2.2 Polen.....	3
2.3 Sporopolen.....	3
2.4 Sentetik İlaç Salınım Sistemler.....	4
2.5 Sporopolen Kullanılan İlaç Salınımı.....	9
3. MALZEME VE YÖNTEM	11
3.1 Polenlerin Toplanması.....	11
3.2 Kimyasallar.....	12
3.3 Karakterizasyon.....	12
3.3.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR).....	12
3.3.2 Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	12
3.3.3 Termogravimetrik analiz (TGA).....	12
3.3.4 Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopu.....	12
3.4 Sporopelen Mikro Kafeslerinin Ekstraksiyonu.....	12
3.5 Sporopolen Mikro Kafeslerine Parasetamol Yüklenmesi.....	14
3.5.1 Pasif yükleme tekniği.....	14
3.5.2 Evaporatör ile yükleme tekniği.....	14
3.6 Yükleme Veriminin Belirlenmesi.....	14
3.7 Parasetamol Yüklü Mikrokafesler ile In Vitro Salımının Belirlenmesi.....	15
3.8 Kinetik Salınımının Belirlenmesi.....	16
3.9 İstatistiksel Analiz.....	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	18
4.1 FT-IR Spektra Analizi.....	18
4.2 SEM Görüntüleri.....	21
4.3 Termogravimetrik Analiz.....	22
4.4 Yükleme Verimliliği.....	23

Sayfa

4.5 In Vitro Parasetamol Salınımı.....	24
4.5.1 Pasif yükleme tekniği.....	24
4.5.2 Evaporatör ile yükleme tekniği.....	24
4.6 Asit ve Fizyolojik pH Koşullarında Kinetik Salınım.....	26
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	28
KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ.....	35



ÖZET

ÇINAR AĞACI (*PLATANUS OREINTALIS*) POLENİNDEN ELDE EDİLEN MİKRO KAPSÜLLERE PARASETAMOL YÜKLENMESİ VE SALINIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bitki polenlerinin dış kısmında bulunan yapı (sporopolen), ilacın kapsüllemesi için yüklenebilir bir materyaldir. *Platanus orientalis*'in polenlerinden sporopolen mikro kafesler üretilmiştir. Burada, *P. orientalis* ağacından sporopolen mikro kafesler, asit ve baz içeren muamelelerle iç kısmındaki materyaller çıkarılarak üretilmiştir. Parasetamol, en yaygın kullanılan analjezik ilaçlardan biridir ve sporopolen mikro kafeslere enkapsüle edilmiştir. Ayrıca polenler, sporopolenler, parasetamol ve parasetamol yüklü sporopolen mikro kafesler ayrı ayrı FT-IR, TGA ve SEM ile karakterize edilmiştir. Analitik analizler, sporopolen mikro kafeslerin yapısal olarak sağlam ve yüksek ağısı yapıda olduğunu ayrıca yüksek termal kararlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Sporopolen mikro kafeslerin, pasif yükleme tekniği ve evaporator ile yükleme tekniği kullanılarak yüklenme etkinliği sırasıyla %8.24 ve %23.7 olarak saptanmıştır. Sporopolen mikro kafeslerin yüklenme için uygunluğu ile salınım ve kinetik çalışmaları pH=1.2 ve 7.4 olan in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, *P. orientalis* sporopolenlerinin ilaç yüklenmesi ve kontrollü salınımı çalışmaları için uygun bir taşıyıcı olduğunu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Salınım kinetiği, ilaç salınımı, mikro kapsül, asetaminofen.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PARACETAMOL LOADING AND RELEASE PROPERTIES OF MICROCAPSULES OBTAINED FROM THE PLANE TREE (*PLATANUS ORIENTALIS*) POLLEN

Exine structure (sporopollenin) found in the outer covering of plant pollens are attractive material for drug encapsulation. Herein, we produced sporopollenin microcages from pollens of *Platanus orientalis* by removing non-exine material with acid and base treatments. Paracetamol, the most widely used analgesic drug, was encapsulated into the sporopollenin microcages. Then, pollen, sporopollenin, paracetamol and paracetamol-loaded sporopollenin microcages were characterised with FT-IR, TGA and SEM. The analytical analyses demonstrated structurally intact, highly reticulated and thermally stable sporopollenin microcages. The encapsulation efficiency of the sporopollenin microcages was found to be 8.24% and 23.7% by passive loading technique and evaporating loading technique respectively. *In vitro* release studies were performed in PBS (pH=7.4) and HCl (pH=1.2) buffer solutions to test the suitability of sporopollenin microcages for encapsulation and to see pH dependency of drug release. This study revealed that sporopollenin from *P. orientalis* can provide a new insight into drug encapsulation studies.

Keywords: non-toxic, drug release, drug delivery, microcapsule, nanopores, acetaminophen.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1: Işık mikroskobu görüntüleri a) <i>Platanus orientalis</i> polen b) sporopolen...	13
Şekil 3.2: Dijital kamera görüntüleri a) pollen b) sporopolen	13
Şekil 4.1: FT-IR spektrumları a) <i>Platanus orientalis</i> polen, b) sporopolen, c) parasetamol ve d) parasetamol yüklü sporopolen mikro kafesler.....	20
Şekil 4.2: SEM görüntüleri: a) <i>Platanus orientalis</i> polen, b) sporopolen, c) parasetamol ve d) parasetamol yüklü sporopolen mikro kafesler.....	21
Şekil 4.3: TGA ve DTG eğrileri: a) <i>Platanus orientalis</i> polen, b) sporopolen, c) parasetamol ve d) parasetamol yüklü sporopolen mikro kafesler.....	23
Şekil 4.4: Pasif yükleme tekniği kullanılarak <i>Platanus orientalis</i> 'ten elde edilen sporopolen mikrokapsülün parasetamol salınım özellikleri: a) PBS içerisinde b) HCl içerisinde.....	25
Şekil 4.5: Evaporator ile yükleme tekniği kullanılarak <i>Platanus orientalis</i> 'ten elde edilen sporopolen mikrokapsülün parasetamol salınım özellikleri: a) PBS içerisinde b) HCl içerisinde.....	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1: Parasetamol-yüklü *Platanus orientalis* sporopolen mikrokafesler için kinetik parametreler..... 27

Çizelge 4.2: Parasetamol yüklü *Platanus orientalis* sporopolen mikro kafeslerinin exponential modeli (yüzey efekti olmadan) kinetik parametreleri..... 27



SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µM	Mikrometre
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Kloroform
DSC	Diferansiyel tarama kalorimetrisi
DTG _{max}	Maksimum Bozunma Sıcaklığı
EDX	Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCl	Hidroklorik Asit
KMEİDS	Kendinden Mikro Emülsiyonlaştırıcı İlaç Dağıtım Sistemleri
KCl	Potasyum Klorit
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum Fosfat
NAPQI	N-asetil-p-benzoquinoneimine
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorit
pH	Hidrojen Potansiyeli
PEG	Polietilen Glikol
PBS	Fosfat Tamponu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TGA	Termal Gravimetrik Analizi
TiO ₂	Titanyum Dioksit
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Mor Ötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Bitki polenlerinden ekstrakte edilen sporopolen kabuklarının daha önce ilaç salınımı için gelecek vaad eden bir mikro-taşıyıcı olduğu ortaya konulmuştur (Paunov vd., 2007). Termal stabilitesi, antioksidan özelliği, kimyasal ve biyolojik ajanlara karşı dayanıklılığı, boyut dağılımındaki homojenite ve gözenekli bir yüzey morfolojisine sahip olması gibi özellikler, sporopolen mikro-kafesleri ilaç yükleme için elverişli bir materyal yapmaktadır (Arrizumi ve Toriyama, 2011; Mundargi vd., 2015). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ilaç salınımında sporopolenlerin üstünlüğünü ortaya koymuştur (Diego-Taboada vd., 2014). Bilindiği üzere, doğada bitkiler tarafından binlerce farklı polen üretilmekte ve bu polenlerin her biri morfolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri bakımından farklı varyasyonlar sergileyebilmektedir (Ollerton vd., 2011). *Lycopodium clavatum* bitkisinin sporopolenleri kontrollü salınım formülasyonlarında yaygın olarak kullanılsada doğada henüz keşfedilmemiş birçok bitki poleni bulunduğu belirlenmiştir (Paunov vd., 2007; Arrizumi ve Toriyama, 2011; Mundargi vd., 2015; Lorch vd., 2009). Bu çalışma kapsamında bir ilk olarak, *P. orientalis* polenlerinden elde edilen sporopolenler ekstrakte edilmiş ve parasetamolün kontrollü salınımı için kullanılmıştır.

Platanus, Kuzey Amerika, Doğu Avrupa ve Asya olmak üzere, kuzey yarımkürede dağılım gösteren yerli büyük ağaç türlerinin bir cinsidir (Grimm ve Denk, 2008; Denk ve Tekleva, 2006). *P. orientalis* türleri (Londra çınar ağacı), Türkiye ve Güney-Batı Asya da dahil olmak üzere Güney-doğu Avrupa'yı kapsayan bölgelerde doğal olarak dağılım göstermektedir. Doğal yaşam alanları vadiler ve sulak alanlar olmakla birlikte ayrıca ılıman bölgelerde yaygın olarak parklara ve bahçelere dikilmektedir (Varela vd., 1997). *P. orientalis* polenin morfolojik özellikleri, tricolpate, orta boy (SEM ölçümlerine dayanarak ortalama kutup eksen: 19.8 µm ve ekvator çapı: 15.8 µm) ve retikülat (ağ) şeklindedir. Retikülüm, çokgen ya da yuvarlak ince ve kaba materyallerden oluşmaktadır (Denk ve Tekleva, 2006).

Parasetamol (N-asetil-p-aminofenol), dünyada en yaygın kullanılan ağrı kesici olsada aynı zamanda, kasıtlı veya kazayla zehirlenmelere en çok neden olan ajan olarak bilinmektedir (Bender vd., 2004). Parasetamol zehirlenmesinin en önemli göstergesi hepatotoksisitedir (karaciğer zehirlenmesi) ve zehirlenmenin en kötü hali ayrıca böbreklerin ve kalbinde etkilenebilmesidir. Zehirlenme 24-48 saat sonra fulminant hepatite neden olabilmektedir (Tillmann vd., 2006). Genellikle parasetamol metabolizması sırasında, parasetamol P450 enzimleri metabolizmanın yalnızca %5-10'luk bölümü olan, N-asetil-p-benzoquinoneimine (NAPQI) olarak adlandırılan ve toksik metabolit üretimi ile sonuçlanan kısımdan sorumludur. Üretilen NAPQI daha sonra glutatyon ile bağlanarak idrar yoluyla toksik-olmayan bir bileşik olarak uzaklaştırılır (Albano vd., 1985). Ancak, parasetamol alımında doz aşımı olması halinde glutatyon miktarı tüm parasetamol bağlamak için yeterli gelmemekte ve karaciğerde toksik maddelerin üretimine yol açmaktadır. Parasetamol zehirlenmesi ile ilgili bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, bu ilacın direkt olarak değil de kontrollü bir şekilde uygulaması gerektiği düşünülmüştür. Parasetamol yüklü sporopollen mikro-kafeslerinin yüksek retikülat (ağsı) yapıları ve mikro gözenekli doğası nedeniyle ilacın daha kontrollü bir şekilde salınımını kolaylaştırabilmektedir. Retikülat yüzey, ilaç molekülleri için gerekli boşlukları sağlayabilmektedir. Doğrudan alınan ilacın salınımı ile karşılaştırıldığında sporopollen mikro-kafeslerinin içine hapsedilen ilacın gözeneklerden kontrollü salınımıyla hepatotoksisite kaynaklı yan etkileri azaltılabilmektedir. Bu çalışmada, *P. orientalis* polenlerinden elde edilen sporopollen mikro-kafeslere parasetamol yüklenmesi ve yüklenen parasetamolün retikülat morfolojiye sahip sporopollen mikro-kafeslerinden kontrollü salınım davranışının incelenmesi amaçlanmıştır. Bozulmamış polen taneleri, sporopollenin mikro-kafesleri, parasetamol ve parasetamol yüklü sporopollen mikro- kafesleri FT-IR, TGA ve SEM analizleri ile karakterize edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Terminoloji

1814'te John tarafından lale polenin dış duvarındaki inert malzeme "polenin" olarak adlandırılmıştır (John, 1814). Daha sonra belirtilen özellik, 1829'da Braconnot tarafından 'hasır otu (*Scirpoides holoschoenus*)' nun polen duvarında belirlenmiş ve 'sporonin' olarak adlandırmıştır. Daha sonra, *Lycopodium clavatum L.*'nin (kuluçka yosunu) sporları kullanılarak materyal analizi yapmak için sistematik bir çalışma yürütülmüş ve önceki terimler birleştirilerek sporopolenin kelimesi oluşturulmuştur (Zetzsche ve Vicari 1931; Zetzsche vd., 1937).

2.2 Polen

Polen tanecikleri ve spor kabukları, bitkinin genetik materyalini dış etkilerden koruyan doğal mikro kafeslerdir. Kabuk iki ayrı katmandan meydana gelmektedir ve büyük oranda selülozdan oluşan iç katmana intin denmektedir. Kimyasal olarak karbon, hidrojen ve oksijen atomlarından oluşmaktadır (Morbelli ve Rowley, 1993). Tam yapısı bilinmemekle birlikte, karotenoidlerin veya çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif bir polimeri olarak tanımlanmaktadır (Punt vd., (2007). Polenin diğer önemli yapı taşları oksijenlenmiş aromatik halkalar ve fenilpropanoid kısımlarıdır (Ahlers vd., 2000).

2.3 Sporopolen

Sporopolen olarak bilinen yapı, bitki polen tanelerinin dış tabakasıdır (Shaw vd., 1988). Sporopolen, organik dünyada bilinen en olağanüstü dayanıklı maddelerden biri olarak tanımlanmaktadır. Sporopolen bitki materyalinin, mikrokapsül oluşturmak için yaygın olarak kullanılan diğer maddelere (örneğin, jelatin, yağ asitler, kitin, selüloz, nişasta ve silika) göre bir takım avantajlar sergilediği belirlenmiştir (Atkin vd., 2005; Barrier vd., 2011). Sporopolenler 500 milyon yıllık antik tortul kayalarda

bozulmamış sporlar olarak bulunan, biyolojik tabiatın en dirençli organik maddeleridir (Pehlivan ve Yıldız, 1988; Barrier vd., 1988). Sporopolen, iyon değişimi ve katı faz peptid sentezi uygulamaları için araştırmacılar tarafından gönüllü olarak işlevselleştirilmiştir (Paunov vd., 2007). Ancak son zamanlarda sporopolenin, yeni ilaç ve nutrasötik salınım sistemlerinin geliştirilmesi için faydalı olabileceği belirlenmiştir. Sporopolenlerin, türe özgü sabit kimyasal yapı ve ebatlara sahip olması, UV ve hava oksidasyonuna karşı koruma sağlayabilmeleri, toksik özellik göstermemeleri, doğal kaynaklardan izole edilmeleri ve ucuz olmaları, hidrofobik ve hidrofilik yükleme için büyük bir iç boşluğa sahip olmaları ve etkili bir salınım avantajı sağlayan elastik mikrokapsüllere sahip olmaları gibi bir çok faydalı özellikleri ile ilaçların ve gıda katkı maddelerinin oral salınımları için en etkin dağıtım sistemleri haline gelmektedir (Blackwell, 2007; Espelie vd., 1989; Rozema vd., 2001). Bunlara ek olarak, sporopolen mikrokapsüller, ilaçların çoğunun protein içermesi sebebiyle asidik ortamlarda denatüre olabilmeleri gibi gastrointestinal sistemin zorlu koşullarına karşı ilaçlara koruma sağlamaktadır (Diego-Taboada vd., 2014).

2.4 Sentetik İlaç Salınım Sistemleri

Attama vd. (2005), kendiliğinden mikro emülsiyon yapan ilaç salınım sistemleri (KMEİDS) üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında, piroksikam etken maddesi, farmasötik açıdan kabul gören sürfaktant veya sürfktant olmadan lipit bir baz içine kapsüllenmiş ve kapsüllenen bu KMEİDS ilaçlarının salınımları ve ilaç içerikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada ilaç salınımının KMEİDS parçacık boyutundan etkilenebileceği öne sürülmüştür. Diğer ilaçlara kıyaslandığında, *Capra hircus*'dan elde edilen homolipidler ile hazırlanan KMEİDS'den salınan piroksikamın, simüle edilmiş bağırsak sıvısında en yüksek oranda olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuca göre bu sistemin geleneksel ilaç salınım yöntemlerine göre çok yönlü ve daha güvenilir bir alternatif olarak önerilmiştir.

Jain vd. (2005)'te yaptıkları çalışmada, ilacın midede mukoza tabakasına temas etmeden kalma süresini arttırmak amacıyla kontrollü bir salınım sistemi önermişlerdir. Bu sistem, gözenekli taşıyıcı olarak kalsiyum silikat, oral bir hipoglisemik ajan olan repaglinid ve polimer olarak Eudragit S içeren yüzen mikrokürelerden oluşmaktadır. Kalsiyum silikat'ın mikroküreler içine karıştırılması ile ilacın istenen serbest salınım

davranışı ve midede mukozaya temas etmeden kalmasını sağlamak için etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur.

Zhan vd. (2006), yaptıkları bir çalışmada, üç farklı monomerin (2-hidroksi-3-fenoksipropilakrilat, 4-hidroksibütül akrilat ve sek-butül tigat) karıştırılmasıyla yeni bir ko-polimer membran hazırlamışlardır. Membranlar, klonidin transdermal ilaç salınım sisteminde doğrusal bir geçirgenlik avantajı sağlamaktadır. Çalışmada membranların farklı monomer oranları ve kalınlıkları ile geçirgenlik özellikleri araştırılmıştır. Optimize edilmiş bir membran FTIR, DSC ve SEM ile karakterize edilmiştir ve 3.0-5.0 mg/ml aralığında klonidin konsantrasyon değerleri için membranlarda sıfıra yakın permeasyon (geçirgenlik) oranı gözlemişlerdir.

Gou vd. (2008), ısıya duyarlı hidrojel içerisindeki nanopartüküllere dayalı yeni bir lokal hidrofobik ilaç salınım sistemini rapor etmişlerdir. Enjekte edilebilen bu hidrofobik ilaç salınım sistemi, honokiol etken maddesinin sürekli salınması için bir depo görevi görebilmektedir. Yapılan çalışmanın sonunda honokiol etken maddesinin nano partiküllerden in vitro salınım profili, kontrollü bir serbest salınım davranışı gösterdiği belirlenmiştir

Singh vd. (2009), çapraz bağlayıcı olarak N, N'-MBAAm ve başlatıcı olarak amonyum persülfat kullanarak sterilya zankı ve poli (AAm)'ye dayalı hidrojelleri sentezlemiştir. Polimerik ağlar SEM, FTIR ve şişme çalışmaları ile karakterize edilmiş ve hidrojenlerden ilaç salınımı Fickian difüzyon mekanizması ile gerçekleştirilmiştir.

Sumi vd., (2008), metal bazlı bir ilaç olan bakır salisilat için, metal şelasyon baskılayıcı ilaç salınım sistemini tanımlamışlardır. Yapılan in-vitro çalışmalarda, polimer materyaline yüklenen ilaçların, serbest ilaçlar ile karşılaştırıldığında daha kontrollü bir salınım modeli ortaya koyduğunu belirlemişlerdir.

Vieira vd. (2008), biyomedikal uygulamalarda kontrollü bir ilaç salınım sistemi olarak kullanılmak üzere üretan bağlantılı nişasta bazlı bir polimer tanımlamışlardır. Nişasta, 2-izosiyanatoetil metakrilat ile modifiye edilmiş ve daha sonra modifiye edilen nişasta, foto-başlatıcı olarak Irgacure® 2959 (CIBA)

kullanılarak UV ışınlanması ile filmler üretmek amacıyla kullanılmıştır. Modifiye edilen polimer FT-IR, SEM ile karakterize edilmiş ve sonrasında polimerin şişme kapasitesi ve su temas açısı ölçümlerini belirlemişlerdir. Timolol maleat ve sodyum flurbiprofen adsorpsiyon ile immobilize edilmiş ve in vitro serbest salınım profilleri spektroskopik olarak izlenmiştir.

Mani vd. (2008), metal implant yüzeylerinden doğrudan ilaç salınımına yönelik yeni alternatif tekniklerin geliştirilmesi araştırılmıştır. Terapötik özelliğe sahip kendiliğinden birleştirilmiş mono-tabakalar, model ilacın (flufenamik asit) kendiliğinden toplanan metal kaplanmış yüzeylere kimyasal olarak bağlanmasıyla hazırlanmıştır. Terapötik özellik gösteren kendiliğinden birleştirilmiş mono-tabakalar, X-ışını fotoelektron spektroskopisi, flüoresan mikroskobu, atomik kuvvet mikroskopisi ve temas açısı gonyometre kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu çalışma, kendi kendine toplanan metal kaplamalı yüzeylerine koroner stentlerden ve diğer metal implantlardan ilaçların salınımı için alternatif sistem olarak önerilmiştir.

Oliveira vd. (2010), yapmış oldukları bir çalışmada aynı anda spesifik biyolojik bozunabilirlik ve pH'ya bağlı ilaç salınımı gösteren çok partiküllü sistemleri geliştirmişlerdir. Bu çok partiküllü sistemler, kitosan, amidlenmiş pektin ve kalsiyum iyonlarına dayanmaktadır. Parçacıkların, gastrointestinal alana benzer bir deney ortamında boyut dağılımı, morfoloji, şişme davranışı ve çözünme testleri için analiz edilmiştir. Selüloz asetat ftalat ve HPMCP'nin bir araya getirilmesi, tüm salınım ortamlarında ilaç salınımı üzerinde en yüksek kontrolü sağladığı tespit edilmiştir. Geliştirilen selüloz asetat ftalat, triamsinolon formülasyonu, asidik ortamda 2 saat inkübe edildikten sonra daha kontrollü bir salınım gözlenirken (%1.33), kontrol formülasyonunda aynı inkübasyon süresinde sonra hızlı salınım (%45.52) gözleendiği rapor edilmiştir.

Singh vd. (2010), çapraz bağlayıcı olarak $CaCl_2$ kullanarak alginat ve sterilya sakızının eş zamanlı iyonotropik jelleşmesiyle gastro-kalıcı yüzen ilaç dağıtım sistemini geliştirmişlerdir. Bu amaçla tasarlanan boncuklar fizikokimyasal olarak analiz edilmiştir. Buna ek olarak, ilaç yüklenen boncuklardan anti-ülser için model ilaç olan pantoprazolün in vitro serbest salınım dinamiği, ilaç salınım

mekanizması ve difüzyon katsayılarının değerlendirilmesi için farklı salınım ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Boncuklardan ilacın salınması Fickian tipi difüzyon mekanizması ile gerçekleştirilmiştir.

Parveen vd. (2011), hidrofobik ilaçların kapsüllemesi için paclitaxel yüklü kitosan ve polietilen glikol kaplı PLGA (PLGA-CS-PEG) nanopartiküllerini geliştirmişlerdir. PLGA-CS-PEG nanoparçacıklar kan dolaşımında etkili bir uzamaya neden olduğu gözlenmiştir. PLGA-CS ve PLGA-CS-PEG nanoparçacıklarının, daha yüksek hücresel alınımının daha büyük oranda antiproliferatif aktivite ile sonuçlanması nedeniyle, PLGA nanoparçacıkları ve doğal paklitaksel üzerinde üstün antiproliferatif etki ve hücre döngüsü inhibisyonu ortaya koyduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, ilaç etken maddesinin PEG ve kitosan ile kaplanması, bilhassa tümör ilacının kontrollü salınımında uygun ve etkili olması, bu çalışmanın ilaç taşıyıcıların tasarlanmasında önemli bir adım olabileceğini göstermiştir.

Saboktakin vd. (2011), kolona ilaç salınım sistemi olarak kitosan-karboksimetil nişasta nanoparçacıklarını incelemişler ve model ilaç molekülü olarak 5-aminosalisilik asiti seçmişlerdir. Ayrıca 5-aminosalisilik asit 'nin in vitro salınımı da değerlendirilmiş ve salınımın gerçekleştiği bölümde 5-aminosalisilik asit bütünlüğü, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak değerlendirilmiştir. Modülasyonuna dayalı olarak geliştirilen kitosan-karboksimetil nişasta nanoparçacıklarının, ilacın kolona kontrollü olarak salınımı için ümit vaadedici bir sistem olduğu rapor edilmiştir. Saboktakin vd. (2011), yaptıkları başka bir çalışmada ise metronidazol benzoat etken maddesinin kontrollü salınımı için tiyolat kitosan-poli metaakrilik asit nanopartikül temelli gelişmiş bir salınım sistemi (mukoadezif) geliştirmiştir. Bu çalışma, metronidazol benzoat etken maddesinin emilim yerindeki tutuklama süresinin nanoparçacıklara formüle edilerek arttırılabileceğini ortaya koymuştur. Metronidazol benzoat'ın tiyolat kitosan-poli metaakrilik asit nanopartikülleri ile hazırlanan nanoparçacıklar içine kapsüllemesi, emilim alanından salınımın hedeflenmesinde, kontrol salınımının devam ettirilmesinde ve oral yollarla verilmesinin geliştirilmesinde yararlı bir yaklaşım oluşturabileceği düşünülmüştür.

Li vd. (2011), yürütmüş oldukları bir çalışmada 5-fluorourasil ve lökovorin etken maddelerinin kapsüllemesi amacıyla iyonik jelyasyon teknolojisi kullanarak kitosan nanopartikülleri üretmişlerdir. FTIR yardımı ile ilacın nanoparçacıklara elektrostatik olarak bağlandığı doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra XRD yardımı ile amorf haldeki nanoparçacıklarda 5-fluorourasil varlığını onaylanmıştır. Hem 5-fluorourasil hem de lökovorinin, sürekli ve kontrollü salınımı yoluyla, salınımın ilk infilakı gözlenmiştir. Sonuçlar kitosan nanoparçacıklarının 5-fluorourasil ve lökovorinin kontrollü salınımı için uygun bir sistem olduğunu göstermiştir.

Yadollahi vd. (2015), çapraz bağlayıcı olarak sodyum tri-polifosfat kullanarak çapraz bağlanmış kitosan hidrojel boncuklarına gümüş nanopartikülleri eklemiştir. Kitosan hidrojel boncuklar içeren gümüş nanopartikülleri 'ler, XRD ve SEM ile analiz edilmiştir. In vitro ilaç salınım testi, bu yeni nanokompozit boncukların etkinliğini göstermek amacıyla kontrollü ilaç salınım sistemi olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında gümüş nanopartiküllerini içeren kitosan boncuklar için devamlı ve daha kontrollü ilaç salınım profili gözlenmiştir.

Safari vd. (2015), yaptıkları bir çalışmada dopamin salınımı için kitosan bazlı yeni bir taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir. Bu amaçla dopamin/kitosan (DOP/CIS) karışımları üretilmiş ve sonra sol-jel yöntemi ile TiO₂ (Titanyum dioksit) ile kaplanmıştır. DOP/CIS, TiO₂ kompozitleri fiziko-kimyasal olarak analiz edilmiştir. DOP/CIS kompozitlerine kıyasla, TiO₂'nin eklenmesi ilacın tutulmasını önemli derecede arttırmış ve ilacın salınımını azaltmıştır. Elde edilen sonuçların çok tatmin edici olduğu ve dopamin kullanımını enjeksiyondan oral yola dönüştürmek için kullanılabileceği önerilmiştir.

Chen vd. (2016), kontrollü ilaç salınımı amacıyla kitosan türevi indirgenmiş grafen oksit ve alginatı kullanarak hidrojel boncuklar üretilmiştir. İlaç yükleme kapasitesi küçük molekül floresein sodyumda %82.8 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada fizyolojik bir pH'da 15 saat içinde %71.6, 20 saat içinde ise %82.4'lük ilaç içeriği ile kontrollü serbest salınım davranışı gözlemlenmiş ve hidrojel boncukların güvenli ve etkili bir ilaç taşıyıcısı olabileceği ortaya konulmuştur.

2.5 Sporopolen Temelli İlaç Salınımı

Diego-Taboada vd. (2013), ibuprofen etken maddesinin, kontrollü salınımını sağlamak için *Lycopodium clavatum* sporopoleni kullanmıştır. Çalışma sonunda ilaç kapsülleme verimi %97±1 olarak kaydedilmiştir. İbuprofenin kapsüllenebildiği, katı hal NMR,

FTIR ve XRD ile gösterilmiştir. Salım verimliliği, simüle edilmiş mide sıvısında 45 dakika sonra 88 ± 1 ve pH 7.4 değerinde 5 dakika sonra 85 ± 2 olarak kaydedilmiştir.

Atwe vd. (2014), ilaç taşıyıcı olarak *Lycopodium clavatum* sporlarını (LS) kullanmışlardır. Ovalbümin yüklü LS'ler farelere oral yolla verilmiştir. LS'ler, pozitif kontrol yardımcı maddesi olarak kolera toksini kullanımı ile indüklenenlere kıyasla, önemli ölçüde daha yüksek anti-ovalbümin serum IgG ve fekal IgA antikorlarını uyarmıştır. Antikor yanıtı mide asidinden etkilenmemiş ve 7 ay boyunca devam etmiştir. Konfokal mikroskopi LS'lerin fare bağırsak duvarına translokasyon yapabileceğini ortaya konulmuş ve bu çalışma genel olarak, *Lycopodium clavatum* sporlarının oral aşı için yeni bir yaklaşım olarak kullanılmasının temelini oluşturmuştur.

Maltaş vd. (2016), doğal malzemelere dayalı yeni bir ilaç sistemi üretmek için sporopolenin yüzeyinde doksorubisin'i albumin'e bağladıkları rapor edilmiştir. İnsan serum albumini, 20mM Tris tamponu içerisinde 7.4 pH değerine sahip süper paramanyetik demiroksit üzerine immobilize edilmiştir. Elde edilen verilere göre HSA'nın bağlanma miktarının, $319.76 \mu\text{M}$, doksorubisin 'i sınırlayan 25mg sporopolenin $285.53 \mu\text{g}$ olduğu tespit edilmiştir. Protein ve ilacın sporopolene bağlanması SEM, EDX ve FT-IR analizi ile netleştirilmiştir.

Alshehri vd. (2016), *Phoenix dactylifera* L.'den izole edilen sporopolen eksin kapsüllerini doğal kompozit bir polimer (epiklorohidrinli karboksimetil selüloz) ile kaplayarak kontrollü ilaç salınımı için kullanmıştır. Polimer kaplı eksin kapsülleri, parasetamolün kontrollü salınımında in-vitro araştırmalarda kullanılmıştır. Sporopolen eksin kapsülleri, polimer kaplı eksin kapsülleri ve ilaç yüklü kapsüller fiziko-kimyasal olarak karakterize edilmiş ve ilaç yükleme kapasitesi %97.2 olarak teyit edilmiştir. Bunun yanı sıra pH değeri 1.4'ten 7.4'e yükseltildiğinde, fizyolojik

tampon çözelti içindeki parasetamolün kümülatif salınım oranları simüle edilmiş gastrik sıvıdakinden iki kat fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Mundargi vd. (2016), *Lycopodium clavatum* sporopolenlerine yüklenen 5-fluorourasilin (kemoterapötik ajan) kontrollü salınımları üzerine bir araştırma yürütmüştür. Çalışmada pasif, sıkıştırma ve vakum yükleme olmak üzere üç farklı kapsülleme tekniği kullanılmıştır. Sporların kapsülleme verimi, pasif ve sıkıştırma yükleme teknikleriyle karşılaştırıldığında vakum yükleme tekniği için %49 olarak kaydedilmiştir ve bu nedenle vakum yükleme formülasyon daha ileri incelemeler için seçilmiştir. Çalışmanın sonucunda simüle edilen gastrointestinal koşullarda 5-fluorourasilin etken maddesinin, kaplanmış spordardan in vitro salınımınının daha yavaş (kontrollü) bir salınım modeli (30 saat) gösterdiği tespit edilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Polenlerin Toplanması

P. orientalis polenleri Kastamonu'dan toplanmıştır (24.04.2013). Örnekler üç gün boyunca oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, polen taneleri saplarından ayrılmış ve daha sonra ilk olarak 10µm'lik elekten ve daha sonra da 50 µm'lik elekten geçirilmiştir. Polenlerin tanımlanması ışık mikroskobu altında teyit edilmiştir.

P. orientalis polen taneleri sferoid (küre) şekillidir ve radyal simetriye sahiptir. Polenler tricolpate açıklıklara ve iri retikülat (ağsı) bir yapıya sahiptir (Denk ve Tekleva, 2006). Polen tanelerinin kutup eksenini ve ekvator çapının ortalama değerleri sırasıyla 18-23 µm ve 17-24 µm olarak ölçülmüştür. Polenlerin iç ve dış kabuk kısımlarının kalınlığı sırasıyla yaklaşık olarak 1.4µm ve 0.7µm olarak belirlenmiştir. Polen taneleri çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere -20°C'de kapalı polietilen tüplerde saklanmıştır.

3.2 Kimyasallar

Parasetamol, Sandoz Syntek Etkin İlaç Hammaddeleri, İstanbul, Türkiye' den, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaOH, NaCl, KCl, CH₃OH, HCl ve CHCl₃ kimyasalları ise Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)'den temin edilmiştir. Deneilerde 7.4 pH değerine ayarlanan fosfat tamponu (PBS) (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl ve KCl den hazırlanmıştır) ve 1.2 pH değerine ayarlanan hidroklorik asit çözeltisi (HCl ve KCl de hazırlanmıştır) olmak üzere iki farklı tampon çözelti kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında steril su kullanılmıştır.

3.3 Karakterizasyon

3.3.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FT-IR)

P. orientalis'in ham polen taneleri, sporopolen mikro-kafesleri, parasetamol ve parasetamol yüklü mikro-kafeslerin kızılötesi spektrumları, 4000-650cm⁻¹ aralığında bir Perkin Elmer 100 FT-IR Spektrometresi 2.5 kullanılarak kaydedilmiştir.

3.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Numunelerin taramalı elektron mikrografikleri (SEM), bir QUANTA FEG 250'de kaydedilmiştir.

3.3.3 Termogravimetrik analiz (TGA)

Numunelerin termogramlar, azot atmosferi altında bir termogravimetrik analiz sisteminde (EXSTAR S11 7300) belirlenmiştir.

3.3.4 Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopu (UV)

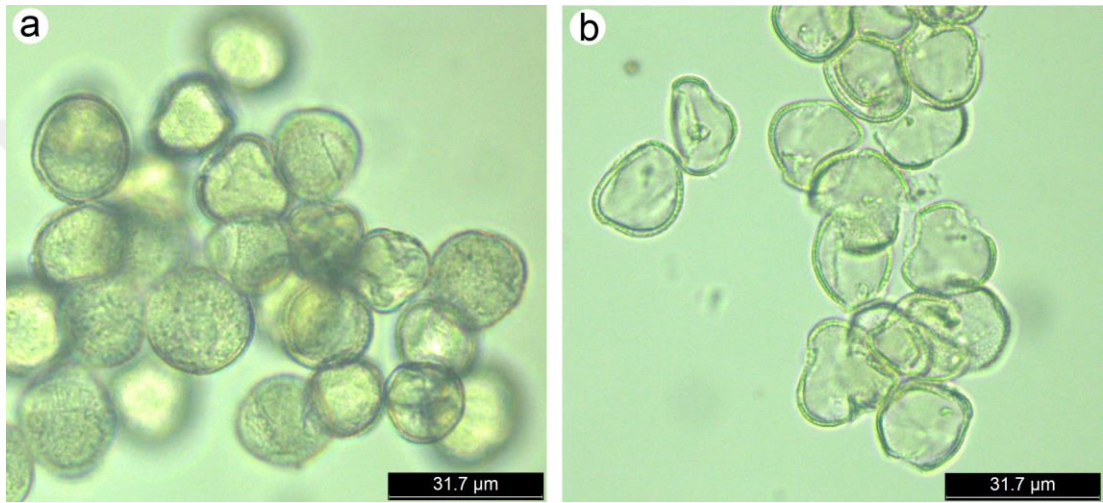
Çözeltilerdeki parasetamol konsantrasyonu, UV-vis spektrofotometresi (Shimadzu, Model 1601, Tokyo, Japonya) üzerinde 243nm'de absorbans okumalarını izleyerek nicel olarak tespit edilmiştir. Kısacası, UV absorbans okumaları ve tampon sistemlerinde ilacın konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi elde etmek için UV standart eğri yöntemi uygulanmıştır.

3.4 Sporopolen Mikro Kafeslerinin Ekstraksiyonu

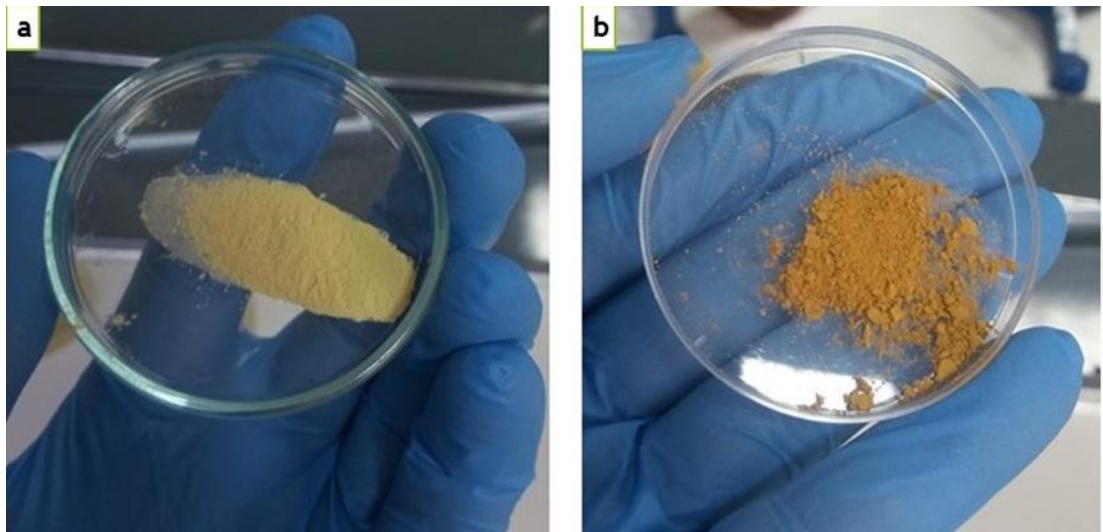
P. orientalis polen granülleri (10g) 40mL 4M HCl solüsyonu ile 50°C'de 1 saat muamele edilmiş, granüller vakum filtrasyon yardımı ile süzülerek saf su ile yıkanmıştır. Asit muamelesinin ardından polen granülleri daha sonra alkali çözeltiye (40mL, 4 M NaOH) aktarılarak 90°C'de 12 saat boyunca bu solüsyon içerisinde tutulmuştur. Ardından vakum filtrasyon işlemi yapılarak elde edilen örnekler steril su ile yıkanmıştır. Polen granül örneklerinin asit ve baz muamele işlemleri aynı koşullar

altında tekrarlanmıştır. Asit-baz muamelesinin ardından polen granülleri kloroform-metanol çözeltisi (1: 1, v: v) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda sporopolen granülleri bol miktarda su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.2).

Genetik materyalin *P. orientalis* polen granüllerinden tamamen uzaklaştırıldığını temin etmek amacıyla bozulmamış polen granülleri ve sporopolen mikro-kafesleri ışık mikroskobu altında incelenmiş ve mikroskop görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 3.1).



Sekil 3.1: Işık mikroskop görüntüleri a) *Platanus orientalis* polen b) sporopolen.



Sekil 3.2: Dijital kamera görüntüleri (a) polen (b) sporopolen.

3.5 Sporopolen Mikro-kafeslerine Parasetamol Yüklenmesi

3.5.1 Pasif yükleme tekniği

Sporopolen mikrokafeslerine parasetamol yüklenme işlemi, geçmişte yapılan bir çalışmada belirtilen pasif yükleme tekniğine bir takım modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Mundargi vd., 2015). Pasif yükleme tekniği a) çevre dostu olması (sert kimyasal kullanımı gerektiren yöntemlere ihtiyaç duyulmaması), b) zaman tasarrufu sağlaması, c) ekonomik olması gibi etkenlerden dolayı tercih edilmiştir. Metotta uygulanan aşamalar kısaca, 100mg parasetamol 4mL etanol içerisinde çözülerek, hazırlanan çözeltiliye 200mg sporopolen mikrokafesleri ilave edilmiş ve elde edilen süspansiyon 10 dakika boyunca vortekslenmiştir. Sporopolen-parasetamol süspansiyonu 4 saat süreyle +4°C'de termostatörde (350 rpm) inkübe edilmiştir. Parasetamol yüklü mikrokafesler, 110µm gözenek çapına sahip membran filtreler yardımı ile süzülmüştür. Filtrasyon işleminin ardından örnekler 3mL saf su ile iki kez yıkandı ve sonrasında bir derin dondurucuda -80°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda parasetamol yüklü sporopolen mikrokafesleri 24 saat oda sıcaklığı koşullarında kuruldu ve daha sonar deneyler de kullanılmak üzere -18°C'de saklanmıştır.

3.5.2 Evaporatör ile yükleme tekniği

Yükleme verimliliğini arttırmak için geliştirilen ve yeni bir yöntem olan evaporatör ile yükleme tekniği kullanılmıştır. 100 mg parasetamol 2 mL etanol içinde çözülmüş ve 200 mg sporopolen ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 10 dakika vortekslenmiştir. Daha sonra numune, 22°C'de evaporatöre yerleştirilmiş (etanol bu sıcaklıkta buharlaşmamıştır) ve 4 saat evapore edilmiştir. İlaça bağlı mikro kafesler filtre edilmiştir. Parasetamol yüklü mikro kafesler, bir dondurucuda -80°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur.

3.6 Yükleme Veriminin Belirlenmesi

Sporopolen mikrokafeslerine yüklenen parasetamol'ün niceliksel analizi geçmişte yapılan bir çalışmada belirtilen tekniğin bir takım modifikasyonları izlenerek

uygulanmıştır (Mundargi vd., 2016). Kalibrasyon eğrisini elde etmek için solüsyonları farklı konsantrasyonlarda (5µg / ml, 10µg / ml, 15µg / ml, 20µg / ml ve 25µg / ml) hazırlanmıştır. Bu solüsyonların absorbansları UV-vis spektrofotometre kullanılarak 243nm'de ölçülmüştür. Kör çözeltileri kullanılarak algılama limiti (LOD) ve nicelik sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0.045 ve 0.15 olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin R2 değeri 0.996 olarak bulunmuştur. Yükleme verimliliğinin belirlenmesi amacıyla, 10mg parasetamol yüklü sporopolen mikro-kafesleri 3mL PBS tampon çözeltisi içerisine aktararak 10 dakika boyunca vortekslenmiştir. Süspansiyon, 110µm gözenekli membran filtre kağıdı yardımı ile filtre edilerek berrak bir çözelti elde edilmiş ve çözeltinin absorbansı, UV-vis spektrofotometre kullanılarak 243nm'de ölçülmüştür. Yükleme verimliliğinin hesaplanması amacıyla aşağıda belirtilen formüller kullanılmıştır.

$$\text{İlaç miktarı (mg)} = (\text{Absorbans} \times \text{seyreltme faktörü}) / (\text{Eğim} \times 1000) \quad (3.1)$$

$$\text{İlaç yükleme (\%)} = (\text{İlaç miktarı} / \text{ilaç yüklü sporopolen kütlesi}) \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{İlaç yükleme etkinliği (\%)} = (\text{Hesaplanan ilaç yükleme} / \text{Teorik ilaç yükleme}) \times 100 \quad (3.3)$$

3.7 Parasetamol Yüklü Mikro Kafesler ile In Vitro Salımının Belirlenmesi

Parasetamol yüklü mikrokafesler (iki yöntemle elde edilen (pasif yükleme tekniği ve evaporatör ile yükleme tekniği kullanılarak)) ile yapılan in vitro ilaç salım çalışmaları 120 saat süreyle yapay bağırsak sıvısı olarak hazırlanan PBS (pH 7.4) ve yapay mide sıvısı olarak hazırlanan HCl (pH 1.2) tampon çözeltileri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hem PBS hem de HCl tampon solüsyonları ile 10mg saf ilaç için in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Metodda uygulanan aşamalar kısaca, 10mg ilaç yüklü mikrokafes 5mL PBS ve 5mL HCl tampon çözeltileri içinde 100rpm'de vortexlenerek süspansiyon edilmiştir. Ardından süspansiyonlar diyaliz torbalarına alınarak 50 mL PBS ve HCl ile hazırlanan serbest salınım ortamlarına yerleştirilmiştir ve inkübatörde 37°C'de 120 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Sporopolen mikrokafeslerinden ortama salınan parasetamol miktarının belirlenmesi amacıyla, farklı zaman aralıklarında (5 dakika, 15 dakika, 20 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 120 saat) salınım ortamlarından 2mL örnek alınmış ve aynı miktarda taze olarak hazırlanan PBS ve HCl tampon solüsyonları salınım ortamları içerisine ilave edilmiştir. Farklı inkübasyon saatlerinde alınan solüsyonlar içerisine salınan

ortalama parasetamol miktarına tekabül eden absorbans değerleri, UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 243 nm'de ölçülmüştür.

Tüm deneyler üç kez tekrarlanmış ve veriler ortalamaları alınarak \pm SD (SD: standart sapma) olarak ortaya koyulmuştur.

Parasetamol'ün kümülatif yüzdesel salınım değerinin hesaplanması amacıyla aşağıda belirtilen formüller kullanılmıştır.

$$\text{İlaç konsantrasyonu (mg / mL)} = (\text{Absorbans} \times \text{Eğim}) \pm \text{kesişim} \quad (3.4)$$

$$\text{İlaç miktarı (mg)} = (\text{Konsantrasyon} \times \text{Çözünme küvet hacmi}) \quad (3.5)$$

$$\text{Kümülatif salınım (\%)} = \left(\frac{\text{Örneğin alındığı hacim (mL)} / \text{Küvet hacmi (mL)}}{\times P(t-1) + P_t} \right) \quad (3.6)$$

P_t , t zamanındaki serbest salınım oranını.

$P(t-1)$, t'den önceki serbest salınım oranını belirtmektedir.

3.8 Kinetik Salınımının Belirlenmesi

Bazı araştırmacıların (Higuchi, 1963; Sood ve Panchagnula, 1999; Qureshi ve Shabnam, 2001) yapmış oldukları çalışmalara göre ilaçların in vitro salınımı, bu ilaçların verilmesinde önemli unsurlardan biri olarak rapor etmiştir. Yüklü ilaçların in vitro olarak salınımının anlaşılması için birçok matematiksel model yaygın olarak kullanılmaktadır (Costa ve Lobo, 2001). Bu çalışmada, mikro-kafeslerden parasetamol salınım kinetiğinin karşılaştırılması amacıyla sıfır derece, birinci derece ve Higuchi kinetik modelleri kullanılmıştır.

Sıfır derece kinetik modeli, aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır.

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (3.7)$$

Q_t , t zamanında salınan kümülatif ilaç miktarını, Q_0 , matristeki ilacın başlangıç miktarını, k_0 , sıfır salımlı sabiti ve t, zamanı ifade etmektedir. Parasetamol'ün salınım kinetiğinin belirlenmesi amacıyla salınan ilacın kümülatif değeri miktar–zaman grafiği çizilerek belirtilmiştir.

Birinci dereceden kinetik model aşağıda verilen formül ile ifade edilmiştir (Costa ve Lobo, 2001);

$$\log Q_t = \log Q_0 + k_1 t / 2.303 \quad (3.8)$$

Q_t , t zamanında salınan kümülatif ilaç miktarı, Q_0 solüsyondaki ilacın başlangıç miktarı, k_1 , birinci dereceden salınım sabiti, t zaman, $k_1 / 2.303$ çizginin eğimini ifade etmektedir. Mikro-kafeslerden salınan parasetamol salınım kinetiğinin açıklanması amacıyla, ilacın günlük kümülatif yüzde değeri – zaman grafiği çizilerek belirtilmiştir.

Higuchi kinetik modeli Fickian difüzyon mekanizmasını temel almakta ve zaman denkleminin sadeleştirilmiş kareköküyle ifade edilmektedir (Higuchi, 1963).

$$Q_t = Q_0 + k_H t^{1/2} \quad (3.9)$$

k_H Higuchi sabiti ve t zamanı ifade etmektedir. İlaç salım kinetiğinin açıklanması amacıyla salınan ilacın kümülatif miktarı-zaman karekökü grafiği çizilerek belirtilmiştir.

3.9 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS 18.0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmalarında genel varyasyonları hesaplamak için tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) kullanılmıştır. Testler % 95 güven aralıklarında yürütülmüştür. Salım çalışmalarının sonuçları, ortalamaları alınarak \pm standart sapma olarak verilmiştir.

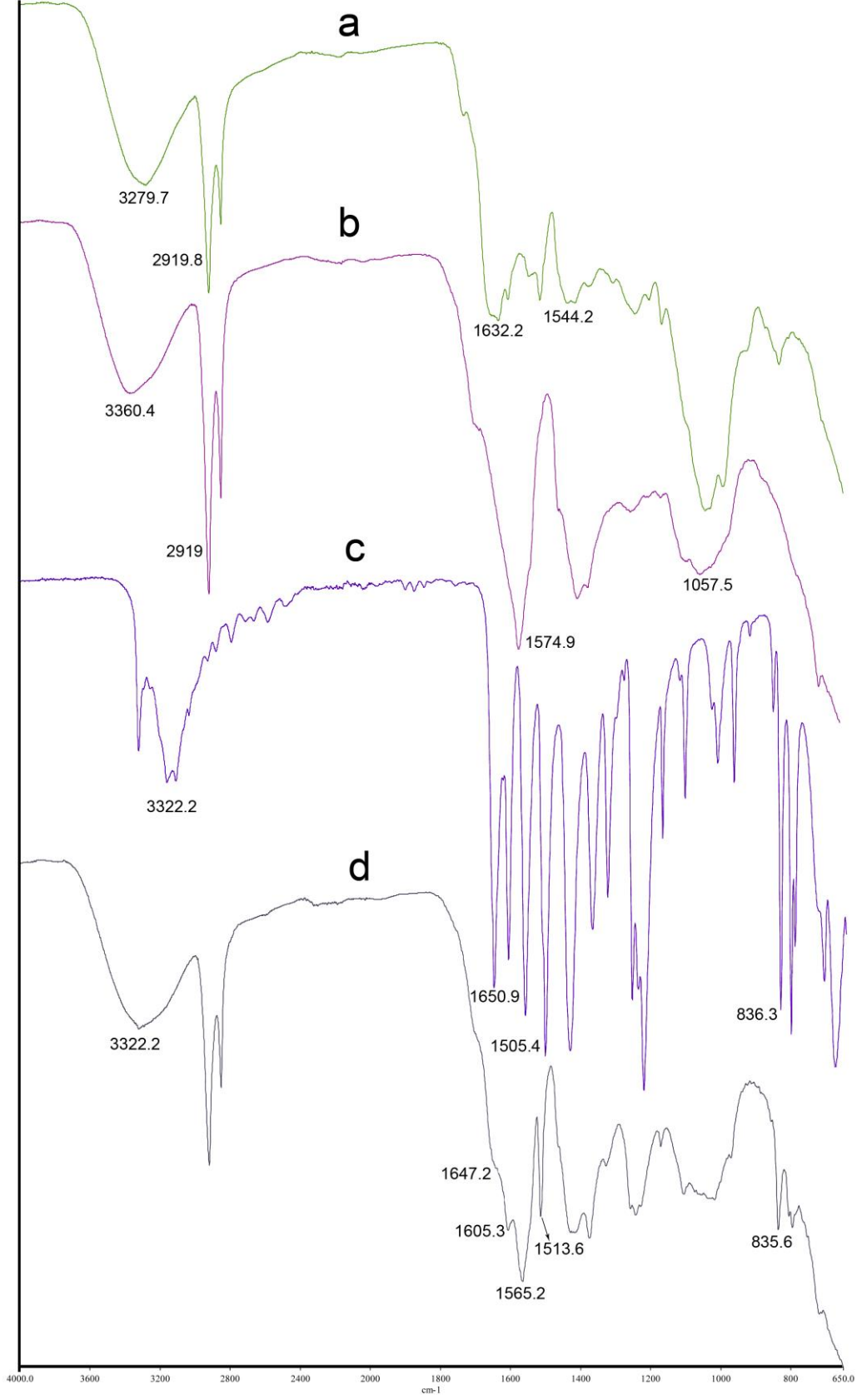
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 FT-IR spektra analizi

Platanus poleninini (Şekil 4.1a) spektrumundaki 3279.7cm^{-1} 'deki geniş pik, alkol, pektin, selüloz ve lignindeki fenol gruplarının O–H geriliminden kaynaklanmaktadır. 2919.8 ve 2851.3cm^{-1} 'deki iki pik alifatik C–H gerilimleriyle ilişkilendirilebilir. 1632.2cm^{-1} 'de ortaya çıkan pik, polenin protein yapılarının amit I bağlarındaki karbonil gruplarına atfedilebilir. Proteinlerin amit II bağlarına ait C–N ve N–H gerilim pikleri 1544.2 ve 1514.7cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Polisakkarit yapısına ait pik ve selülozun C–O–C gerilimleri 992.56 ve 1043.9cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Ekstraksiyon işleminden sonra, sporopolenin spektrumundaki O–H gerilim titreşimine ait geniş pik 3360.4cm^{-1} 'e kaydığı görülmüştür (Şekil 4.1b). Bu geniş pik çapraz bağlı polimerin yapısında bulunan su moleküllerinin O–H gruplarına ait olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, sporopolenin spektrumunda yeni pikler tespit edilmiştir. 2919.0 ve 2850.8cm^{-1} 'deki keskin pikler doymamış yağ asitlerin yan zincirlerinin alifatik C–H gerilim titreşimlerine aittir. 1574.9cm^{-1} 'deki keskin pik, sporopolenin doymamış yağ asit yapılarındaki alifatik C=C gerilimlerine ait olabilir. 1408.1cm^{-1} 'de gözlemlenen pik yağ asit yapılarının karboksilat gruplarının simetrik gerilimlerine atfedilebilir. Polisakkarit yapısına karşılık gelen C–O–C geriliminin titreşimleri 1057.5cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Parasetamole ait FT-IR spektrumu Şekil 4.1c'de verilmiştir. Disubstitüye amit gruplarının karakteristik absorpsiyon bantları 3322.2cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. $3000\text{--}3500\text{cm}^{-1}$ 'de görülen geniş bant fenolik –OH grupların kuvvetli hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda bu geniş bant bu bölgedeki diğer pikleri de örtmüştür. Mesela, aromatik C–H 3000cm^{-1} 'deki gerilim titreşimi açık bir şekilde gözlemlenmemiştir. 1650.9cm^{-1} 'deki keskin pik amit gruplarının C=O geriliminden kaynaklanmaktadır. Aromatik halka ve halka yan gruplarından kaynaklanan ve fenil gruplarının varlığını gösteren C=C gerilim titreşimlerini 1609.7cm^{-1} ve 1505.4cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. 1561.7cm^{-1} 'deki pik N–H amit eğilme titreşimlerine aittir. C–N gerilim titreşimi 1224.6cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır.

Para-substitüye aromatik halkaların karakteristik piki 836.3 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Sporoplene parasetamol yüklenmesinin ardından sporopolenin spektrumunda karakteristik değişiklikler gözlemlenmiştir (Şekil 4.1d). Bazı pikler yer değiştirirken veya kaybolurken, spektrumda yeni pikler gözlemlenmiştir. Parasetamol moleküllerinin etkileşiminin sonucunda O–H piki 3322.2 cm^{-1} 'e kaydığı belirlenmiştir. Doymamış yağ asitlerinin C=C gerilim bandı (1565.2 cm^{-1}) ilacın aromatik C=C gerilim bandıyla (1605.3 cm^{-1}) çakıştığı ve bu pikler 1647.2 cm^{-1} 'deki ilacın C=O pikini belirsizleştirdiğini gözlenmiştir. Aynı zamanda, parasetamol yüklü sporopolenin spektrumunda ikinci aromatik C=C gerilim pikleri 1513.6 cm^{-1} 'e kaydığı belirlenmiştir. Para-substitüye aromatik halkanın karakteristik piki 835.6 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir.

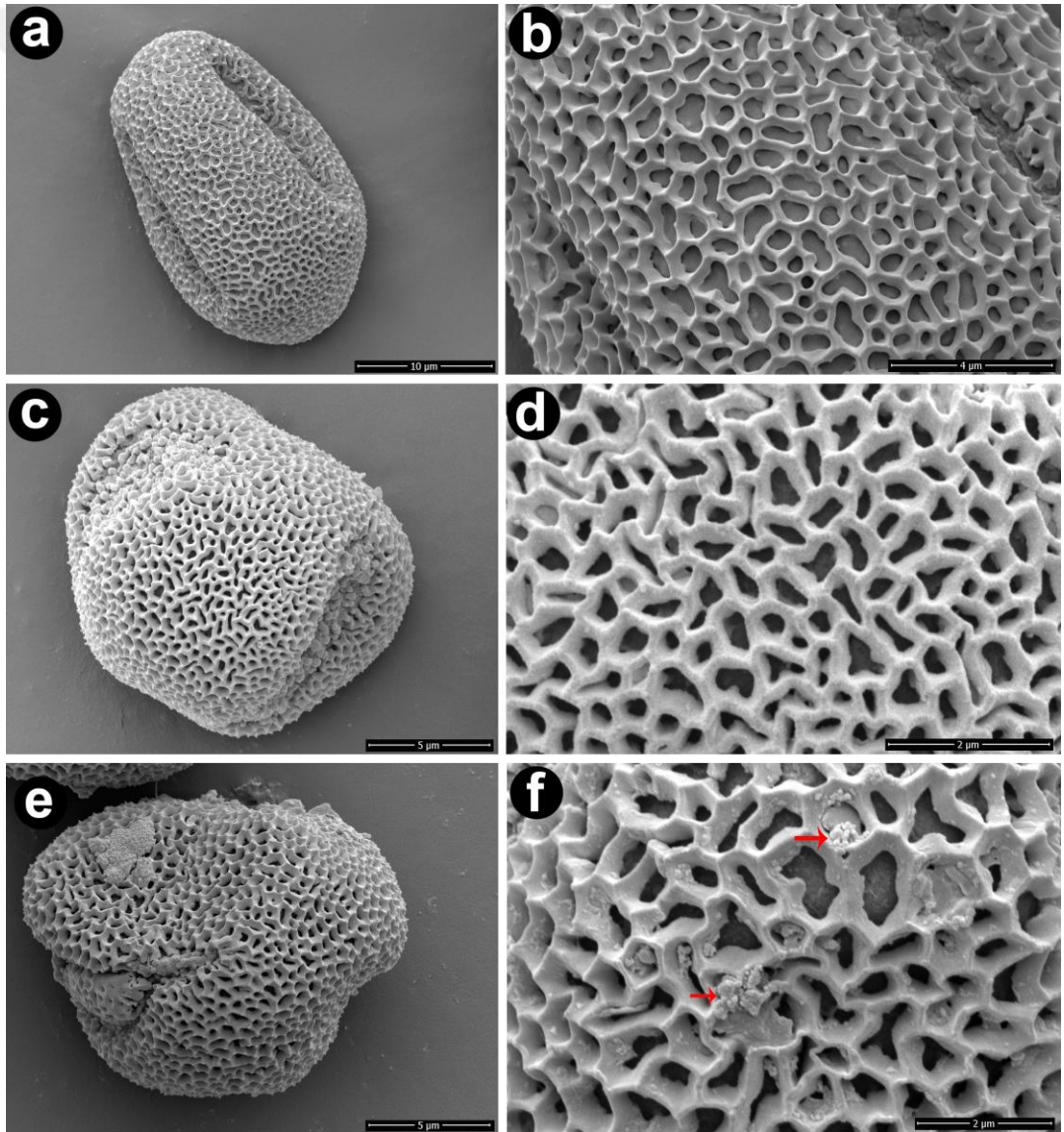




Şekil 4.1: FT-IR spektrumları (a) *Platanus orientalis* polen, (b) sporopolen, (c) parasetamol ve (d) parasetamol yüklü sporopolen mikrokafesler.

4.2 SEM görüntüleri

Şekil 4.2a, b’de görüldüğü gibi, *P. orientalis* poleni yüksek oranda gözenekli ve ağısı yüzey yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. Sporopolen ekstraksiyon işlemi genetik materyal ve exine yapısının hemen altındaki tabaka başarıyla uzaklaştırılmıştır. Yine de, exine’nin yapısal bütünlüğü korundu ve sporopolen mikrokafeslerin yüzeyinde çatlaklar gözlemlenmemiştir. Ayrıca, ekstraksiyon işlemindeki kimyasal muamelesi exine yapısında olmayan tabakayı ayırdığı ve yüzeydeki gözenek sayısı arttığı görülmüştür (Şekil 4.2c,d). Bazı gözenekler ilaç yüklenme işlemi parasetamol ile dolduruldu kanıtlanmıştır (Şekil. 4.2e, f).

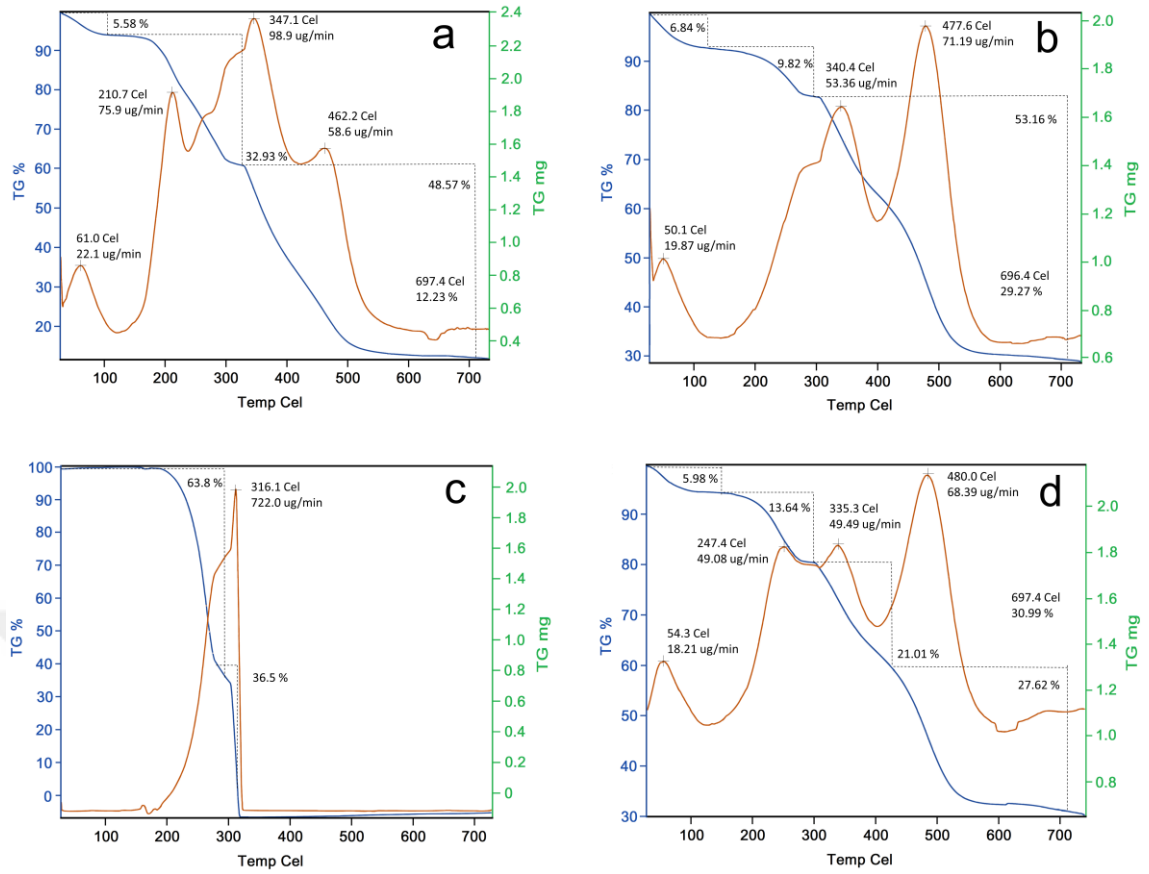


Şekil 4.2: SEM ile: (a) *Platanus orientalis* poleni, (b) sporopolen, (c) parasetamol ve (d) parasetamol yüklü sporopolen mikrokafeslerin görüntüleri.

4.3 Termogravimetrik analiz

P. orientalis pollen, sporopollen, parasetamol ve parasetamol-yüklü sporopolen kapsullerin termal özellikleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Polen için dört farklı dekompozisyon aşaması kaydedilmiştir. Sporopolen için üç farklı dekompozisyon aşaması gözlemlenmiştir ve 480°C'deki pik keskindi, bu yüzden *P. orientalis*'ten elde edilen sporopolenin termal kararlılığının yüksek olduğu şeklinde yorumlanabilir. Parasetamol iki aşamada bozunmuştur. İlk aşama 200-300°C arasında gerçekleşmiştir ve bu parasetamol yapısındaki fenol halkasının bozunmasına atfedilebilir. İkinci faz, 300 ve 330°C (maksimum 316°C) arasında kaydedilmiştir ve bu, parasetamolün yapısındaki asetamidin ayrışmasına atfedilebilir. Parasetamol yüklü sporopolen mikrokafesler dört aşamada bozunmuştur. 100°C'ye kadar ilk safha, bağlı suyun buharlaşmasına atfedilebilir. İkinci safha (247°C civarında maksimum bozunma), parasetamolün bozulması nedeniyle olmuştur. Bu arada, üçüncü ve dördüncü aşamalar sporopolenin ayrışmasına kaynaklanmıştır.

L. clavatum'dan elde edilen ticari sporopolen ve Phoenix dactylifera'dan elde edilen sporopolenin, 250–400°C aralığında ayrıştığı rapor edilmiştir. *P. orientalis* poleninden elde edilen sporopolen, daha iyi termal stabilite göstermiştir ve yaklaşık 480°C'de termal ayrışma gerçekleşmiştir (Gubbuk vd., 2012; Alshehri vd., 2016; Alshehri vd., 2016). Selüloz ve kitin gibi doğada bol olarak bulunan diğer biyopolimerlerle karşılaştırıldığında *P. orientalis* sporopolen termal olarak daha karardır. Bitkilerden elde edilen bir başka yapısal biyopolimer olan selülozun termal bozunması, 300–350°C'de gerçekleşir ve hayvan kaynaklı yapısal polimer kitin, 350–400°C'de ayrışır (Yang vd., 2007; Wang vd., 2013). Ayrıca, sporopolen konsantre asit çözeltilerine karşı daha dayanıklıdır ve hidroliz olmaz. Öte yandan yapısal biyopolimerler selüloz ve kitin konsantre asit solüsyonları ile hidrolize edilir (Bondeson vd., 2006; Rupley, 1964). Yüksek termal kararlılığı olan sporopolen zorlu şartların uygulandığı çeşitli süreçlerde kullanılabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.3: TGA ve DTG eğrileri: a) *Platanus orientalis* polen, b) sporopolen, c) parasetamol ve d) parasetamol yüklü sporopolen mikrokafeşler.

4.4. Yükleme Verimliliği

Parasetamolün sporopolen mikrokafeşlere pasif yükleme tekniği kullanılarak yükleme verimliliği %8.24 olarak kaydedilmiştir. Bu düşük yükleme verimliliği, parasetamol-yüklü sporopolen mikrokafeşlerin hazırlanmasında kullanılan pasif yükleme tekniğine atfedilebilir. Daha önceki çalışmalarda, sıkıştırma veya vakum yükleme teknikleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında yükleme verimliliği değerinin pasif yükleme tekniği ile kıyaslandığında oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (Mundargi vd., 2016). Diğer taraftan evaporatör tekniği kullanılarak yükleme verimliliği %23.7 olarak kaydedilmiştir. Bununla birlikte, FT-IR spektrum analizi, SEM görüntüleri ve in vitro salım çalışmaları, sporopolen mikrokafeşlere parasetamol yüklenmesini doğrulamıştır.

4.5 In Vitro Parasetamol Salınımı

Sporopollen mikrokafeşlerden ve serbest parasetamol'ün salınım davranışını karşılaştırmak için parasetamol yüklü sporopollen mikrokafeşlerle in vitro salınım

çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH değerine bağımlı ilaç salınım tespiti için ilacın ve mikrokafeslerin uygunluğunu test etmek amacıyla in vitro salım çalışmaları PBS (pH = 7.4) ve HCl (pH = 1.2) tampon çözeltileri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

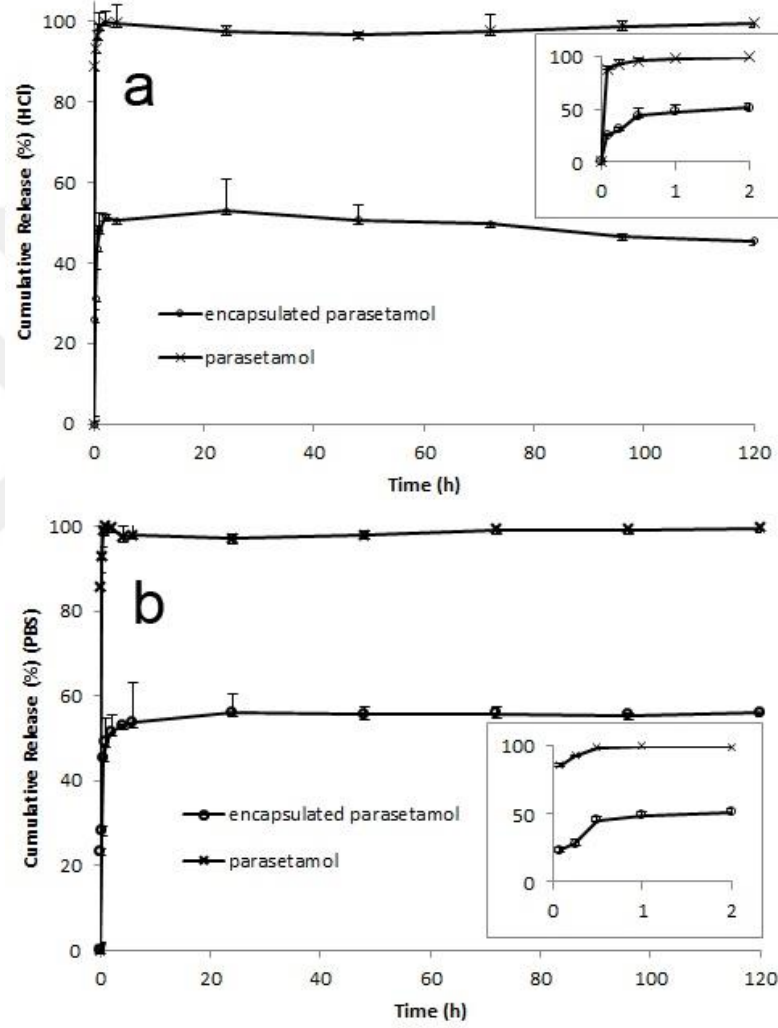
4.5.1 Pasif yükleme tekniği

Parasetamolün mikro kafeslerden salınım ortamına başlangıç salınım miktarının ilk saatte hızlı olduğu ve zamanla (120. saat) yavaşladığı görülmüştür. PBS ve HCl solüsyonları içerisinde serbest ilaç ve ilaç yüklü sporopollen mikro-kafeslerinin kümülatif salınım yüzdeleri Şekil 4.4a,b'de gösterilmiştir. Bu sonuç, sporopollen mikrokapsül yüzeyinden absorbe olan parasetamol moleküllerinin hızla ortama salındığını göstermiştir. Bununla birlikte, mikrokafeslere tutuklanmış parasetamol molekülleri daha kontrollü salım davranış sergilediği gözlenmiştir. Mikrokafeslerden kümülatif ilaç salınımı pH 7.4 için 24 saat içerisinde %55.98±1.87 oranında gerçekleşirken, serbest ilaç salınımının ise 15 dakika içinde tamamlandığı belirlenmiştir. HCl tampon çözeltisinde, mikrokafeslere tutuklanmış parasetamolün ilk ani salınımı, ilk 15 dakika içinde %31.18±3.55 olarak bulunmuştur. Aynı koşullar altında, serbest parasetamol ortama daha hızlı bir şekilde salınmıştır. Tutuklanmış ilaç örnekleri, serbest ilaç numunelerine kıyasla hem PBS hem de HCl tamponlarında biraz daha yüksek kontrollü salınım tarzı sergilemiştir. Bu çalışma sporopolenin mikrokafeslerden parasetamol salınım davranışının, ortamın pH'ındaki farklılıklara fazla bağımlı olmadığını göstermiştir. Ayrıca, aynı eğilim serbest parasetamol için de gözlemlenmiştir.

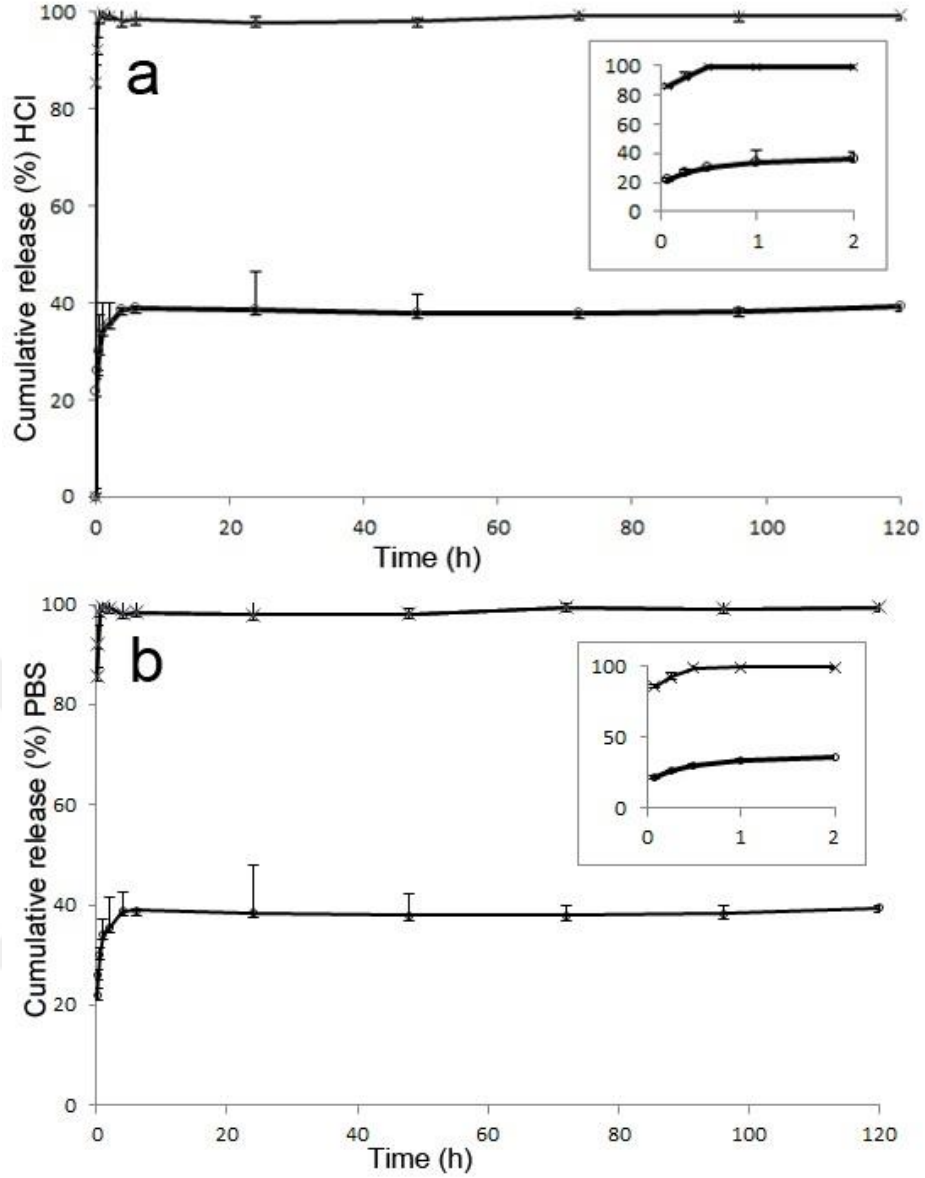
4.5.2 Evaporatör ile yükleme tekniği

Evaporatör ile yükleme tekniğinin serbest bırakma profili Şekil 4.5a, b 'de PBS ve HCl için sırasıyla gösterilmiştir. Saf ilacın PBS ve HCl tampon çözeltilerinde sırasıyla tamamen serbest bırakılması 6 saat ve 4 saat içinde gözlenmiştir. Serbest ilacın PBS ve HCl için sırasıyla ilk 5 dakikadaki kümülatif yüzdesel salım oranı % 88.8 ± 1.87 ve % 85.64 ± 0.31 olarak kaydedilmiştir. Bununla birlikte, parasetamol yüklü sporopolen mikro kafes, PBS'de ilk 5 dakika boyunca % 21.94 ± 0.28'lik bir minimal başlangıç salınım hızı göstermiştir. İlk hızla salınımdan sonra, in vitro salınım çalışması sırasında sürekli olarak % 26.29 ± 0.15 ve % 39.51 ± 0.08 salınım yüzdesi aralığında kontrollü salınım gerçekleşmiştir. Benzer sonuçlar HCl tampon çözeltisi için de bulunmuştur. Mikro kafes içine sıkışan parasetamolün başlangıçtaki hızlı

salınım yüzdesi, ilk 5 dakika içinde 22.52 ± 0.16 olduğu bulunmuş ve sonraki 120 saat boyunca yavaş salınım yüzdesinin ise 29.23 ± 0.59 ve 33.23 ± 0.19 aralığında olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, *P. orientalis* sporpoleninden parasetamolün in vitro salınımının, aynı koşullardaki serbest ilaç salınımından daha kontrollü olduğunu önermektedir. Ayrıca, in vitro serbest salınım çalışması, başlangıç hızlı salınım etkisinin evaporatör ile yükleme tekniği sayesinde düşürülebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.4 : *Platanus orientalis*'ten elde edilmiş sporopolen mikrokapsülün parasetamol salınım özellikleri: a) PBS içerisinde b) HCl içerisinde.



Şekil 4.5: Evaporatör ile yükleme tekniği ile *Platanus orientalis*'ten sporopolen mikrokapsüllerinin serbest bırakılması: a) PBS çözeltisi içinde ve b) HCl çözeltisi içinde.

4.6 Asit ve Fizyolojik pH Koşullarında Kinetik Salınım

Bu çalışmada, PBS (pH 7.4) ve HCl tampon çözeltileri (pH 1.2) içinde mikrokafeslerden salınan parasetamol salınım kinetiğini değerlendirmek için sıfır derece, birinci derece ve Higuchi kinetik modeller kullanılmıştır. Tablo 1'de gösterildiği gibi, tüm matematiksel modeller için daha yüksek R^2 değerleri elde edilmiş ve Higuchi modelinin, her iki pH değeri için sıfır-derece ve birinci-derece modellere göre daha yüksek bir korelasyon katsayısı (R^2) sergilediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, Higuchi modelinin R^2 'si hala kabul edilebilir bir seviyede değildir ve

parasetamolün mikrokafeslerden Fickian difüzyonuyla salındığı sonucuna varılamamıştır. İlacın salınım davranışı, her üç modele de tam bir uyum gösteremediği belirlenmiştir.

Yüzey etkisinin etkisini kontrol etmek için, daha önce bir çalışmada Yin vd., (2014) açıklandığı gibi exponential bir model kullanılmıştır ve düşük R^2 değerleri kaydedilmiştir (Tablo 2). Bu düşük R^2 değerleri, yüzey etkisinin önemsiz olduğunu göstermektedir. Ayrıca, exponential fonksiyon göz önüne alındığında, daha büyük B değerleri, daha hızlı salınım oranına atıfta bulunmaktadır. Burada, evaporatör ile yükleme tekniğinde göreceli olarak düşük B değerleri kaydedilmiştir ve bu da sporopolen mikro kafeslerden parasetamolün daha kontrollü olarak salındığını göstermektedir.

$$y = Ae^{-Bx} \quad (4.1)$$

Burada y sporopolen mikro kafeslerdeki parasetamol tutma fraksiyonu, A ve B sabitler ve x zamanı belirtmektedir.

Çizelge 4.1: Parasetamol-yüklü *Platanus orientalis* sporopolen mikrokafesler için kinetik parametreler.

Kinetik modeller	Sıfır-derece		Birinci-derece		Higuchi	
	R^2	k_0	R^2	k_1	R^2	k_H
PBS (pH=7.4)	0.7114	7.0751	0.6493	0.0834	0.8283	16.3120
HCl (pH=1.2)	0.5583	5.4718	0.5145	0.0728	0.6957	13.0520

Çizelge 4.2: Parasetamol yüklü *Platanus orientalis* sporopolen mikro kafeslerinin exponential modeli (yüzey efekti olmadan) kinetik parametreleri.

Kinetik modeller(PBS pH: 7.4)	Sıfır-derece		Birinci-derece		Higuchi	
	R^2	B	R^2	B	R^2	B
Pasif Yükleme	0.6493	0.1919	0.6315	0.0535	0.7739	0.4477
Evaporatör ile Yükleme	0.4052	0.0010	0.4036	0.0003	0.9160	0.0163

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, yüksek oranda retikülat (ağsı) yüzey ve termal kararlılığa sahip olan sporopollen mikrokafesler ilk kez *P. orientalis*'den ekstrakte edilmiştir. Parasetamol, pasif yükleme tekniği kullanılarak sporopollen mikrokafeslerine yüklenmiştir. Çalışılan yükleme tekniğinin etkinliği, daha önce yapılmış bir çalışma olan Alshehri vd. (2016) hurma bitkisinden elde edilen sporopolen (*P. dactylifera*), karboksimetil selüloz ve piklorohidrin ile kaplanması ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Buna karşın, yeni geliştirilen evaporatör ile yükleme tekniği kullanılarak yükleme verimliliği arttırılmıştır. Bu yaklaşım, parasetamol-sporopolen salma sisteminin tasarımı için daha uygun bir yöntem olarak önerilebilmektedir. *P. orientalis*'den elde edilen sporopolenin ilaç yükleme verimliliğini arttırmak için modifiye edilebileceği düşünülmektedir. Serbest parasetamol moleküllerinin, ortama (PBS ve HC1 tamponları) daha hızlı salım sergilediği gözlenirken, parasetamol-yüklü sporopollen mikrokafeslerin, her iki salınım ortamında daha kontrollü salınım tarzı gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte farklı yüzey özelliklerine sahip (ağsı, gözenekli ve açıklıkları olan yapılar) sporopolenin, parasetamol için etkili bir taşıyıcı olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahlers, F., Bubert, H., Steuernage, S. ve Wiermann, R., 2000. The Nature of Oxygen in Sporopolen from the Pollen of *Typha angustifolia* L, Zeitschrift für Naturforschung C, 55, 3-4 , 129-136.
- Albano, E.M., Rundgren, P., Harvison, S., Nelson, P. Moldeus, 1985. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity, Molecular Pharmacology, 28, 306-311.
- Alshehri, S. M., Al-Lohedan, H. A., Chaudhary, A. A., Al-Farraj, E., Alhokbany, N., Issa, Z. ve Ahamad, T., 2016. Delivery of ibuprofen by natural macroporous sporopolen exine capsules extracted from *Phoenix dactylifera* L, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 88, 158-165.
- Alshehri, S.M., Al-Lohedan, H.A., Al-Farraj, E., Alhokbany, N., Chaudhary, A.A., ve Ahamad, T., 2016. Macroporous natural capsules extracted from *Phoenix dactylifera* L. spore and their application in oral drugs delivery, International Journal of Pharmaceutics, 504, 39-47.
- An, J., Luo, Q., Yuan, X., Wang, D. ve Li, X., 2011. Preparation and characterization of silver-chitosan nanocomposite particles with antimicrobial activity, Journal of Applied Polymer Science, 120, 6, 3180-3189.
- Arrizumi, T., ve Toriyama, K., 2011. Genetic regulation of sporopolen synthesis and pollen exine development, Annual review of plant biology, 62, 437-460.
- Atkin, S. L., Beckett, S. T. ve Mackenzie, G., 2005. U.S. Patent Application No. 11,721,782.
- Attama, A. A. ve Nkemnele, M. O., 2005. In vitro evaluation of drug release from self micro-emulsifying drug delivery systems using a biodegradable homolipid from *Capra hircus*, International journal of pharmaceutics, 304, 1, 4-10.
- Atwe, S. U., Ma, Y. ve Gill, H. S., 2014. Pollen grains for oral vaccination, Journal of Controlled Release, 194, 45-52.
- Barrier, S., Diego-Taboada, A., Thomasson, M. J., Madden, L., Pointon, J. C., Wadhawan, J. D., ve Mackenzie, G., 2011. Viability of plant spore exine capsules for microencapsulation, Journal of Materials Chemistry, 21, 4, 975-981.

- Bender, R.P., Lindsey, R.H., Burden, D.A., ve Osheroff, N., 2004. N-acetyl-p-benzoquinone imine, the toxic metabolite of acetaminophen, is a topoisomerase II poison, *Biochemistry*, 43, 3731-3739.
- Blackwell, L. J., 2007. Sporopolen exines as a novel drug delivery system, Doctoral dissertation, University of Hull.
- Bondeson, D., Mathew, A. ve Oksman, K., 2006. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis, *Cellulose*, 13, 171-180.
- Braconnot, H, 1829. Recherches chimiques sur le pollen du *Typha latifolia*, *Annals of Chemical Physics*, 42, 91-105.
- Chen, K., Ling, Y., Cao, C., Li, X., Chen, X. ve Wang, X., 2016. Chitosan derivatives/reduced graphene oxide/alginate beads for small-molecule drug delivery, *Materials Science and Engineering: C*, 69, 1222-1228.
- Costa, P. ve Lobo, J.M.S., 2001. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13, 123-133.
- Denk, T. ve Tekleva, M.V., 2006. Comparative pollen morphology and ultrastructure of *Platanus*: Implications for phylogeny and evaluation of the fossil record, *Grana*, 45, 195-221.
- Diego-Taboada, A., Beckett, S.T., Atkin, S.L. ve Mackenzie, G., 2014. Hollow pollen shells to enhance drug delivery, *Pharmaceutics*, 6, 80-96.
- Diego-Taboada, A., Maillet, L., Banoub, J. H., Lorch, M., Rigby, A. S., Boa, A. N. ve Mackenzie, G., 2013. Protein free microcapsules obtained from plant spores as a model for drug delivery: Ibuprofen encapsulation, release and taste masking, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 5, 707-713.
- Espelie, K. E., Loewus, F. A., Pugmire, R. J., Woolfenden, W. R., Baldi, B. G. ve Given, P. H., 1989. Structural analysis of *Lilium longiflorum* sporopolen by ¹³C NMR spectroscopy, *Phytochemistry*, 28, 3, 751-753.
- Gou, M., Li, X., Dai, M., Gong, C., Wang, X., Xie, Y. ve Wei, Y. 2008. A novel injectable local hydrophobic drug delivery system: biodegradable nanoparticles in thermo-sensitive hydrogel, *International journal of pharmaceutics*, 359, 1, 228-233.
- Grimm, G.W. ve Denk, T., 2008. ITS evolution in *Platanus* (Platanaceae): homoeologues, pseudogenes and ancient hybridization, *Ann Bot-London*, 101, 403-419.
- Gubbuk, I.H., Ozmen, M. ve Maltas, E., 2012. Immobilization and characterization of hemoglobin on modified sporopolen surfaces, *Int J Biol Macromol*, 50, 1346-1352.

- Higuchi, T., 1963. Journal of Pharmaceutical sciences, 52, 1145-1149.
- Jain, S. K., Awasthi, A. M., Jain, N. K. ve Agrawal, G. P., 2005. Calcium silicate based microspheres of repaglinide for gastroretentive floating drug delivery: Preparation and in vitro characterization, Journal of controlled release, 107, 2, 300-309.
- John, J. F. 1814. Ueber den Befruchtungsstaub, nebst einer Analyse des Tulpenpollen, Journal of Chemical Physics, 12, 244.
- Li, P., Wang, Y., Peng, Z., She, F. ve Kong, L., 2011. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends, Carbohydrate polymers, 85, 3, 698-704.
- Lorch, M., Thomasson, M.J., Diego-Taboada, A., Barrier, S., Atkin, S.L., Mackenzie, G. ve Archibald, S.J., 2009. MRI contrast agent delivery using spore capsules: controlled release in blood plasma, Chemical Communications, 6442-6444.
- Maltas, E., Gubbuk, I. H. ve Yildiz, S., 2016. Development of doxorubicin loading platform based albumin-sporopolen as drug carrier, Biochemistry and Biophysics Reports, 7, 201-205.
- Mani, G., Johnson, D. M., Marton, D., Feldman, M. D., Patel, D., Ayon, A. A. ve Agrawal, C. M., 2008. Drug delivery from gold and titanium surfaces using self-assembled monolayers, Biomaterials, 29, 34, 4561-4573.
- Morbelli, M. A. ve Rowley, J. R., 1993. Megaspore development in Selaginella. I. "Wicks", their presence, ultrastructure, and presumed function, Sexual Plant Reproduction, 6, 2, 98-107.
- Mundargi, R. C., Tan, E. L., Seo, J. ve Cho, N. J., 2016. Encapsulation and controlled release formulations of 5-fluorouracil from natural *Lycopodium clavatum* spores, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 36, 102-108.
- Mundargi, R.C., Potroz, M.G., Park, S., Park, J.H., Shirahama, H., Lee, J.H., Seo, J. ve Cho, N.J., 2015. *Lycopodium* Spores: A Naturally Manufactured, Superrobust Biomaterial for Drug Delivery, Advanced Functional Materials, 26, 487-497.
- Oliveira, G. F., Ferrari, P. C., Carvalho, L. Q. ve Evangelista, R. C., 2010. Chitosan-pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery, Carbohydrate polymers, 82, 3, 1004-1009.
- Ollerton, J., Winfree, R. ve Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals?, Oikos, 120, 321-326.
- Paunov, V.N., Mackenzie, G. ve Stoyanov, S.D., 2007. Sporopolen micro-reactors for in-situ preparation, encapsulation and targeted delivery of active components, Journal of Material Chemistry, 17, 609-612.

- Pehlivan, E. ve Yildiz, S., 1988. Modified sporopolen as a novel anion, cation and ligand exchange medium, *Analytical letters*, 21, 2, 297-309.
- Punt, W., Hoen, P. P., Blackmore, S., Nilsson, S. ve Le Thomas, A., 2007. Glossary of pollen and spore terminology, *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143, 1, 1-81.
- Qureshi, S.A. ve Shabnam, J., 2001. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12 271-276.
- Rozema, J., Broekman, R. A., Blokker, P., Meijkamp, B. B., de Bakker, N., van de Staij, J. ve Kars, S. M., 2001. UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopolen: the perspective to track historic UV-B levels, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62, 1, 108-117.
- Rupley, J., 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrate for lysozyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, BBA)-Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides, 83, 245-255.
- Saboktakin, M. R., Tabatabaie, R. M., Maharramov, A. ve Ramazanov, M. A., 2011. Synthesis and in vitro evaluation of carboxymethyl starch–chitosan nanoparticles as drug delivery system to the colon, *International journal of biological macromolecules*, 48, 3, 381-385.
- Saboktakin, M. R., Tabatabaie, R. M., Maharramov, A. ve Ramazanov, M. A., 2011. Development and in vitro evaluation of thiolated chitosan—poly (methacrylic acid) nanoparticles as a local mucoadhesive delivery system, *International journal of biological macromolecules*, 48, 3, 403-407.
- Safari, M., Ghiaci, M., Jafari-Asl, M. ve Ensafi, A. A., 2015. Nanohybrid organic–inorganic chitosan/dopamine/TiO₂ composites with controlled drug-delivery properties, *Applied Surface Science*, 342, 26-33.
- Shaw, G., Sykes, M., Humble, R. W., Mackenzie, G. ve Pehlivan, E., 1988. The use of modified sporopolen from *lycopodium clavatum* as a novel ion-or ligand-exchange medium, *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, 9, 2, 211-217.
- Singh, B. ve Sharma, N., 2009. Mechanistic implication for cross-linking in sterculia-based hydrogels and their use in GIT drug delivery. *Biomacromolecules*, 10, 9, 2515-2532.
- Singh, B., Sharma, V. ve Chauhan, D., 2010. Gastroretentive floating sterculia–alginate beads for use in antiulcer drug delivery, *Chemical engineering research and design*, 88, 8, 997-1012.
- Sood, A. ve Panchagnula, R., 1999. *STP pharma sciences*, 9, 157-168.

- Sumi, V. S., Kala, R., Praveen, R. S. ve Rao, T. P., 2008. Imprinted polymers as drug delivery vehicles for metal-based anti-inflammatory drug, *International journal of pharmaceutics*, 349, 1, 30-37.
- Parveen, Suphiya. ve Sanjeeb, K. Sahoo., 2011. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery, *European journal of pharmacology* 670, 2, 372-383.
- Tillmann, H., Hadem, J., Leifeld, L., Zachou, K., Canbay, A., Eisenbach, C., Graziadei, I., Encke, J., Schmidt, H. ve Vogel, W., 2006. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience, *Journal of viral hepatitis*, 13, 256-263.
- Varela, S., Subiza, J., Subiza, J.L., Rodríguez, R., García, B., Jerez, M., Jiménez, J. ve Panzani, R., 1997. *Platanus* pollen as an important cause of pollinosis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100, 748-754.
- Vieira, A. P., Ferreira, P., Coelho, J. F. J. ve Gil, M. H., 2008. Photocrosslinkable starch-based polymers for ophthalmologic drug delivery, *International journal of biological macromolecules*, 43, 4, 325-332.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z. ve Xue, C., 2013. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill, *Euphausia superba*, *Carbohydrate Polymer*, 92, 90-97.
- Yadollahi, M., Farhoudian, S. ve Namazi, H., 2015. One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems, *International journal of biological macromolecules*, 79, 37-43.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H. ve Zheng, C., 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis, *Fuel*, 86, 1781-1788.
- Yin, R., Wang, K., Du, S., Chen, L., Nie, J. ve Zhang, W., 2014. Design of genipin-crosslinked microgels from concanavalin A and glucosyloxyethyl acrylated chitosan for glucose-responsive insulin delivery, *Carbohydrate polymers*, 103, 369-376.
- Zetzsche, F. ve Vicari, H., 1931. Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen III. 2. *Picea orientalis*, *Pinus silvestris* L., *Corylus Avellana* L. *Helvetica, Chimica Acta*, 14, 1, 62-67.
- Zetzsche, F., Kalt, P., Liechti, J. ve Ziegler, E., 1937. Zur Konstitution des *Lycopodium-Sporonins*, des *Tasmanins* und des *Lange-Sporonins*. XI. Mitteilung über die Membran der Sporen und Pollen, *Journal für Praktische Chemie*, 148, 9-10, 267-286.

Zhan, X., Tang, G., Chen, S. ve Mao, Z. 2006. A new copolymer membrane controlling clonidine linear release in a transdermal drug delivery system, International journal of pharmaceutics, 322, 1, 1-5.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Muhammad Mujtaba
Doğum Tarihi ve Yeri : 15.03.1992 Swabi/ PAKİSTAN
E-posta adresi : muhammadmujtaba443@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : University of SWABI, 2010-2014
Ziraat Bölümü
Swabi/ PAKİSTAN

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2014-2016
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü
Aksaray/ TÜRKİYE

YURTDIŞI DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. İki ay staj, Basque Country Üniversitesi, İSPANYA / Erasmus Staj Programı
2. TÜRKİYE Bve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
2215 - Uluslararası Öğrenciler İçin Lisansüstü Burs.

YAYINLAR

1.1 SCI, SCI Expanded Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

1. **Mujtaba, M.**, Sargin, İ., Akyuz, L., Ceter, T., Kaya, M., 2016. Paracetamol encapsulation by sporopolen microcages isolated from *Platanus orientalis* pollens, *Material Science and Engineering C (Materials for Biological Applications)*.
1. Kaya, M., **Mujtaba, M.**, Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L. ve Sofi, K., 2015. Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee, *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16.
2. Kaya, M., Odabasi, M., **Mujtaba, M.**, Sen, M., Bulut, E. ve Akyuz, B., 2016. Novel three-dimensional cellulose produced from trunk of *Astragalus gummifer* (fabaceae) tested for protein adsorption performance, *Materials Science and Engineering: C*, 62, 144-151.
3. **Mujtaba, M.**, Sargin, I., Kaya, M., 2016. Determination of Bovine Serum Albumin Adsorption Capacity of Newly Obtained Cellulose extracted from *Glycyrrhiza glabra* (Licorice, , *Advances in Polymer Technology*.

4. Kaya, M., Bittim, B., **Mujtaba, M.**, 2015. Surface morphology of chitin highly related with the isolated body part of butterfly (*Argynnis pandora*, (International Journal of Biological Macromolecules).
5. Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I., **Mujtaba, M.**, 2016. Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp, Carbohydrate polymers 145, 64-70.
6. Kaya, M., Bulut, E., **Mujtaba, M.**, Sivickis, K., Sargin, I., Akyuz, B., Erdogan, S., 2016. Gender influences differentiation of chitin among body parts, Archives of Insect Biochemistry and Physiology 93 (2), 96-109.
7. Kaya, M., Akyuz, L., Sargin, I., **Mujtaba, M.**, Salaberria, A M., Labidi, J., Cakmak, Y S., Koc, B., Baran, T., Ceter, T., 2016. Incorporation of sporopollenin enhances acid–base durability, hydrophobicity, and mechanical, antifungal and antioxidant properties of chitosan films, Journal of Industrial and Engineering Chemistry.
8. **Mujtaba, M.**, Sargin, İ., Akyuz, L., Ceter, T., Kaya, M., 2016. Paracetamol encapsulation by sporopolen microcages isolated from *Platanus orientalis* pollens, Material Science and Engineering C (Materials for Biological Applications).

1.2 Uluslararası Sempozyumda Sunulan ve Tam Metin Olarak Basılan Yayınlar

Kaya, M., **Mujtaba, M.**, Bulut, E., Akyuz, B., “Recycling and physicochemical characterization of pomegranate waste peels into a green material (cellulose)” International conference on Natural Science and Engineering (ICNASE’16), DOI: 10.13140/RG.2.1.4844.8405 , 19-20 March 2015, Kilis, TURKEY.

1.3 Uluslararası Sempozyumda Sunulan Bildiriler

Kaya, M., **Mujtaba, M.**, Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L., Sofi, K., “Extraction and characterization of chitins from coachroach *Oothecca*” 9th International Scientific Conference, The Vital Nature Sign-9, DOI: 10.13140/RG.2.1.4307.4405, May 2015, Kaunas, LITHUANIA.

Mujtaba, M., Kaya, M., “Exploitation of *Thypha latifolia* (broadleaf cattail) flower spikes as a resource for cellulose production” 2nd International congress on the world of technology and advanced material, 28 september 2016 Kırşehir/ TÜRKİYE.

Sargin, İ., **Mujtaba, M.**, Akyuz, L., Ceter, T., Kaya, M., Paracetamol encapsulation by sporopolen microcages isolated from *Platanus orientalis* pollens, 3rd symposium on aerobiology, palynology, and latest advancements in allergy, 5-7 november, Kastamonu university, TÜRKİYE.

1.4 Ulusal Sempozyumda Sunulan Bildiriler

Bulut, E., Kaya, M., Sargın İ., Akyuz, B., **Mujtaba, M.**, “Kitosan Mikrokapsül Hazırlanması ve Karakterizasyonu” 1. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, 23-24 Şubat 2016, Kayseri, TÜRKİYE.

