T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

LİPOZOMAL JUGLON FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE DOMATES PATOJENLERİ ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra SAYARIM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

TEMMUZ 2024

T.C.
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

LİPOZOMAL JUGLON FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE DOMATES PATOJENLERİ ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra SAYARIM
(22435020006)
ORCID: 0000-0002-4276-1559

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL
ORCID: 0000-0002-1786-1216
İkinci Danışman: Prof. Dr. Serap ACAR
ORCID: 0000-0002-6662-6642

TEMMUZ 2024

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 230Y005 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kübra SAYARIM

İmzası:

Bilim yolculuğundaki tüm kadınlara,

ÖNSÖZ

Verdiği daimi destekle, anlayışla ve bilgiyle yol gösteren sevgili danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL'a ve lisans yıllarımdan beri akademiyi sevmemin sebebi sevgili eş danışmanım Prof. Dr. Serap ACAR'a,

Bilgisini ve danışmanlığını bizden esirgemeyen Doç. Dr. Sümer HORUZ'a,

Her sıkıntımda destek veren Dr. Öğr. Üyesi Pelin PELİT ARAYICI'ya

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesi için sağladığı imkanlardan dolayı Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne ve Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümündeki Biyopolimerler ve Aşılar Laboratuvarı'na,

Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne,

Dertlerime ortak olan çalışma arkadaşlarıma,

Her kararımda yanımda olup destekleyen, bugün olduğum insan olmamı sağlayan sevgili annem Gülhan SAYARIM'a ve babam Faruk SAYARIM'a, canım kardeşim İsmail Hakkı SAYARIM'a,

Sürecin zorluklarını benimle birlikte yaşayıp sabırla bekleyen, hayatımı güzelleştiren sevgili nişanlım Hüseyin BEZİR'e,

ve tüm sevdiklerime teşekkürü bir borç bilirim.

Temmuz 2024

Kübra SAYARIM
(Biyomühendis)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **viii**
KISALTMALAR ..... **x**
SEMBOLLER ..... **xi**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xiv**
SUMMARY ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1 Domates (*Solanum lycopersicum* L.) 4
2.2 Domatesteki Bakteriyel Hastalıklar 5
2.2.1 Bakteriyel solgunluk ve kanser 5
2.2.2 Bakteriyel solgunluk 5
2.2.3 Bakteriyel benek 6
2.2.4 Bakteriyel leke 6
2.3 Pestisitler 7
2.3.1 Biyopestisitler 7
2.4 Juglon 8
2.5 Pestisit Taşıyıcı Sistemler 10
2.5.1 Nanoemülsiyonlar 11
2.5.2 Nanoenkapsülasyonlar ve nanopartiküller 12
2.5.3 Nanojeller 13
2.5.4 Lipozomlar 13
2.5.4.1 Lipozomların oluşum mekanizması 13
2.5.4.2 Lipozom hazırlama yöntemleri 15
2.5.5 Siklodekstrinler 18
3. MATERYAL VE METOD **20**
3.1 Materyal 20
3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar 20
3.1.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar 20
3.1.3 Deneylerde kullanılan patojen bakteri izolatları 21
3.2 Metod 21
3.2.1 Juglon kalibrasyon eğrisinin hazırlanması 21
3.2.2 Juglon/β-siklodekstrin inklüzyon kompleksinin hazırlanması 22
3.2.3 Boş lipozom ve lipozomal formülasyonların hazırlanması 22
3.2.4 Formülasyonların karakterizasyonu 23

3.2.4.1 Kompleksin inklüzyon oranının (İO), juglon yükleme kapasitesinin (YK) ve reaksiyon veriminin (RV) belirlenmesi 23
3.2.4.2 J/β-CD/L formülasyonunun enkapsülasyon etkinliğinin (EE) belirlenmesi 24
3.2.4.3 Boyut, PDI ve zeta potansiyel analizi 24
3.2.4.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi 24
3.2.4.5 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi 25
3.2.5 *In vitro* juglon salımı 25
3.2.6 Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi 25
3.2.6.1 İnokulum hazırlanması 25
3.2.6.2 Agar disk difüzyon testi 25
3.2.6.3 Minimum inhibisyon konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon testi 26
3.2.7 Tohum çimlenme testi 27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 29
4.1 Juglon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması 29
4.2 Kompleksin İnklüzyon Oranı, Yükleme Kapasitesi ve Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi 30
4.3 J/β-CD/L Formülasyonunun Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Belirlenmesi 31
4.4 Formülasyonların Boyut, Polidispersite İndeksi Ve Zeta Potansiyel Analizi 31
4.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi 34
4.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 35
4.7 *In vitro* Juglon Salımı 38
4.8 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi 39
4.8.1 Agar disk difüzyon testi 39
4.8.2 Minimum inhibisyon konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon testi 41
4.9 Tohum Çimlenme Testi 44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 63

KISALTMALAR

CD : Siklodekstrin
CLSI : Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DMSO : Dimetil Sülfoksit
EE : Enkapsülasyon Etkinliği
FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GUV : Dev Tek Katmanlı Veziküller
İO : İnklüzyon Oranı
LUV : Büyük Tek Katmanlı Veziküller
MBK : Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MİK : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MLV : Çok Katmanlı Veziküller
MVV : Multivesiküler Veziküller
PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi
PDI : Polidispersite İndeksi
RV : Reaksiyon Verimi
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
STEM : Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskopisi
SUV : Küçük Tek Katmanlı Veziküller
TSA : Triptik Soya Agar
TSB : Triptik Soya Broth
YK : Yükleme Kapasitesi

SEMBOLLER

~	**:** Yaklaşık
±	**:** Artı eksi işareti
β	**:** Beta
μg	**:** Mikrogram
μL	**:** Mikrolitre
%	**:** Yüzde
mg	**:** Miligram
mL	**:** Mililitre
mV	**:** Milivolt
v	**:** Hacim

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Lipozom türleri ve partikül boyutları. **15**
Çizelge 3.1 : Kullanılan kimyasal malzemeler ve bilgileri..... **20**
Çizelge 3.2 : Kullanılan ekipmanlar ve bilgileri..... **20**
Çizelge 4.1 : Kompleksin inklüzyon oranı, juglon yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimi. **30**
Çizelge 4.2 : J/β-CD/L formülasyonun boyut, PDI ve Zeta potansiyel değerleri. **32**
Çizelge 4.3 : Formülasyonların inhibisyon zonları (mm)..... **39**
Çizelge 4.4 : Formülasyonların MİK değerleri..... **41**
Çizelge 4.5 : Formülasyonların MBK değerleri. **42**
Çizelge 4.6 : Juglon, J/β-CD ve J/L örneklerinin MBK için ekilen petri görüntüleri. **43**
Çizelge 4.7 : J/β-CD/L formülasyonunun MBK belirlenmesi için yapılan ekim sonucu petri görüntüleri. **44**
Çizelge 4.8 : Günlere göre çimlenen tohum sayısı **46**
Çizelge 4.9 : Çimlenmemiş tohum sayısı, çürük tohum sayısı ve çimlenme yüzdesi **48**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Juglonun kimyasal yapısı. **9**
Şekil 2.2 : Pestisit taşınımında kullanılan bazı nanopartiküller: a) lipid bazlı nanopartiküller, b) inorganik nanopartiküller, c) polimer bazlı nanopartiküller, d) nanofiberler, e) nanojeller. **11**
Şekil 2.3 : Nanomalzemeler ile aktif bileşenler arasındaki etkileşimlerin şematik gösterimi: (a) Farklı kapsülasyon yöntemleri (b) pestisit nanoformülasyonlarının saha uygulaması ve (c) çeşitli çevresel koşullar altında nanoformülasyonlardan ilaç salımı. **12**
Şekil 2.4 : Lipozom yapısı ve oluşumu **14**
Şekil 2.5 : Lipozomların sınıflandırılması. **14**
Şekil 2.6 : İnce film hidrasyon yöntemi..... **16**
Şekil 2.7 : β-siklodekstrinin kimyasal yapısı. **19**
Şekil 3.1 : Deneyin şematik gösterimi. **22**
Şekil 3.2 : Mikrodilüsyon testi şematik gösterimi. **27**
Şekil 4.1 : Juglona ait kalibrasyon eğrisi. **29**
Şekil 4.2 : J/β-CD/L formülasyonunun boyut dağılım grafiği. **32**
Şekil 4.3 : J/β-CD ve J/β-CD/L formülasyonlarının karşılaştırmalı boyut dağılım grafiği. **33**
Şekil 4.4 : J/β-CD/L formülasyonun zeta potansiyel grafiği. **34**
Şekil 4.5 : Malzemelerin FTIR spektrumu. **35**
Şekil 4.6 : J/β-CD inklüzyon kompleksinin a) 50 000 büyütmeli (ölçek: 200 nm) b) 150 000 büyütmeli (ölçek: 100 nm) STEM mikrografları. **36**
Şekil 4.7 : Lipozomal J/β-CD formülasyonunun a) 20 000 büyütmeli (ölçek: 200 nm) b) 150 000 büyütmeli (ölçek: 100 nm) STEM mikrografları. **37**
Şekil 4.8 : Lipozomal J/β-CD formülasyonundan juglonun *in vitro* salım profili. ... **38**
Şekil 4.9 : Serbest juglon, J/β-CD, J/β-CD/L ve J/L'nin (A) Pst, (B) Xeu ve (C) Cmm suşları üzerindeki inhibisyon zonları..... **40**
Şekil 4.10 : Domates tohumları ekilmiş petriler (1.Gün). **45**
Şekil 4.11 : Çimlenen tohumlar (14.gün); a) negatif kontrol b) J/β-CD/L 3..... **47**

LİPOZOMAL JUGLON FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE DOMATES PATOJENLERİ ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Bitki temelli doğal antibakteriyel ajanlar, ilaca dirençli suşları kontrol etmede etkin rol oynamaktadır. Bu aktiflerden biri olan juglon, bitki hastalıklarının mücadelesinde kullanılmak üzere, güçlü antimikrobiyal özelliklere ve geniş uygulama alanlarına sahip bir molekül olarak öne çıkmaktadır. Suda çözünmemesi, kolay oksidasyonu ve zayıf biyoyararlanımı gibi dezavantajlarının bulunması ise endüstride kullanımını sınırlamaktadır. Juglonun dağıtımı için lipozom gibi nano-taşıyıcıların kullanılması, bu kısıtlamaların üstesinden gelebilecek bir stratejidir. Hidrofobik maddelerin lipozomal enkapsülasyonunda karşılaşılan problemlerin üstesinden gelmek için araştırmacılar siklodekstrinleri lipozomal ilaç formülasyonlarına dahil ederek özelliklerini iyileştirmektedir.

Bu tez kapsamında; üretilen juglon/β-siklodekstrin inklüzyon kompleksinin, literatürde ilk kez lipozomlara enkapsülasyonunun çalışılması amaçlanmıştır. Kompleksin inklüzyon oranı, yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimi incelenmiş, formülasyonun enkapsülasyon etkinliği, boyut, polidispersite indeksi (PDI), ve zeta potansiyeli belirlenmiştir. Formülasyonların fizikokimyasal karakterizasyonu için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), morfolojik karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Juglon salımı diyaliz yöntemi ile *in vitro* incelenmiştir. *Pseudomonas syringae pv. tomato* (SH-1), *Xanthomonas euvesicatoria* (SH-2) ve *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (SH-3) bakteri suşları üzerinde agar disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak antibakteriyel aktiviteleri *in vitro* incelenmiştir. Antibakteriyel aktivitenin görüldüğü konsantrasyon belirlendiğinde bu konsantrasyon baz alınarak uygulanan formülasyonların domates tohum çimlenmesi üzerine etkisi 14 gün boyunca gözlemlenmiştir.

Hazırlanan inklüzyon komplekslerinin inklüzyon oranı %79,3, yükleme kapasitesi %11,8 ve reaksiyon verimi %89,4 olarak, juglon/β-siklodekstrin lipozomal formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği %72,88, boyutu 106,1 ± 0,5 nm, PDI değeri 0,247 ± 0,012 ve zeta potansiyeli -49,2 ± 1,36 mV olarak ölçülmüştür. FTIR sonuçları juglonun çoğunlukla β-CD kavitesinde olduğunu ve lipozomal enkapsülasyonun da başarılı olduğunu göstermektedir. SEM sonuçları yüzeyleri düz, düzgün bir boyut dağılımda, yuvarlak partiküllerin oluşturulduğunu doğrulamıştır. Salım çalışması lipozomlardan juglon salımının bifazik salım profilinde olduğunu ve kümülatif salımın 72 saatte %46,73 olduğunu göstermiştir. Agar disk difüzyon testine göre J/β-CD/L formülasyonu Pst üzerine 9 mm, Xeu üzerine 10,6 mm ve Cmm üzerine 8 mm inhibisyon zonu göstermiştir.

J/β-CD/L'nin SH-1, SH-2 ve SH-3 üzerindeki MİK değerleri sırasıyla 68,93 µg/mL, 34,47 µg/mL ve 68,93 µg/mL olarak, MBK değerleri ise 68,93 µg/mL, 68,93 µg/mL ve 137,87µg/mL olarak hesaplanmıştır. J/β-CD/L'nin kontrollü salım yapması nedeniyle test edilen her üç patojen bakteri türü için de serbest juglona göre antibakteriyel aktivitesinin 2 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Tohum çimlenme testine göre 14. günün sonunda en çok çimlenen set 73,75 µg/ml serbest juglon içeren; 0,625 mg/mL J/β-CD/L konsantrasyonunda formülasyon ile muamele edilmiş tohumlar olmuş ve çimlenme yüzdesi de %86,67 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; tez kapsamında geliştirilen juglon/β-CD'in lipozomal enkapsülasyonu hidrofobik bir molekül olan juglonun çözünürlüğünü arttırmış ve maddenin biyoyararlanımını iyileştirmiştir.

Anahtar kelimeler: Juglon, Lipozom, *Pseudomonas syringae pv. tomato, Xanthomonas euvesicatoria*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, Biyopestisit.

DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL JUGLONE FORMULATION AND DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY ON TOMATO PATHOGENS

SUMMARY

Plant-based natural antibacterial agents play an effective role in controlling drug-resistant strains. One of these actives, juglone, stands out as a molecule with strong antimicrobial properties and wide application areas for the control of plant diseases. Its disadvantages, such as insolubility in water, easy oxidation and poor bioavailability, limit its use in industry. The use of nanocarriers such as liposomes for the delivery of juglone is a strategy that can overcome these limitations. To overcome the problems encountered in liposomal encapsulation of hydrophobic substances, researchers are incorporating cyclodextrins into liposomal drug formulations to improve their properties.

In this thesis; it was aimed to study the encapsulation of the juglon/β-cyclodextrin inclusion complex produced for the first time in the literature. The inclusion ratio, loading capacity and reaction efficiency of the complex were investigated, and the encapsulation efficiency, size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of the formulation were determined. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used for physicochemical characterization, and scanning electron microscopy (SEM) was used for morphological characterization.Juglone release was studied *in vitro* by dialysis method. Antibacterial activities of *Pseudomonas syringae pv. tomato* (SH-1), *Xanthomonas euvesicatoria* (SH-2) and *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (SH-3) were investigated in vitro using agar disk diffusion and microdilution methods. When the concentration at which antibacterial activity was observed was determined, the effect of the formulations applied based on this concentration on tomato seed germination was observed for 14 days.

The inclusion rate, loading capacity and reaction efficiency of the prepared inclusion complexes were 79.3%, 11.8% and 89.4%, respectively. The encapsulation efficiency of the juglone/β-cyclodextrin liposomal formulation was 72.88%, the size was 106.1 ± 0.5 nm, the PDI value was 0.247 ± 0.012, and the zeta potential was -49.2 ± 1.36 mV. FTIR results show that the juglone is mostly in the β-CD cavity and liposomal encapsulation is also successful. SEM results confirm the formation of round particles with smooth surfaces and a uniform size distribution. The release study showed that the release of juglone from liposomes had a biphasic release profile and the cumulative release was 46.73% at 72 hours. According to the agar disk diffusion test, the J/β-CD/L formulation showed an inhibition zone of 9 mm on Pst, 10.6 mm on Xeu and 8 mm on Cmm. The MIC values of J/β-CD/L molecule on SH-1, SH-2 and SH-3 were 68.93 µg/mL, 34.47 µg/mL and 68.93 µg/mL, respectively, and the MBC values were 68.93 µg/mL, 68.93 µg/mL and 137.87 µg/mL, respectively. The controlled release of J/β-CD/L resulted in a determined antibacterial activity that was found to be 2 times higher than that of free juglone for all three pathogenic bacterial species tested. According to

the seed germination test, the most germinated set at the end of the 14th day was the seeds treated with the formulation containing 73.75 µg/ml free juglone at a concentration of 0.625 mg/mL J/β-CD/L and the germination percentage was 86.67%.

In summary, the liposomal encapsulation of J/β-CD/L, developed as part of the thesis, resulted in enhanced solubility of juglone, a hydrophobic molecule, and contributed to improved bioavailability of the substance.

Keywords: Juglon, Liposome, *Pseudomonas syringae pv. tomato, Xanthomonas euvesicatoria*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, Biopesticide.

1. GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İnsan kaynaklı faaliyetler; tarım alanlarında azalma, iklim değişikliğinin sonuçlarıyla birlikte toprağın ve bitkilerin kalitesi ile verimliliğinin bozulması, su kaynaklarının kirlenmesi gibi çevre ve ekosistemler üzerinde olumsuz etkiler bırakmaktadır (Liu ve diğ., 2021). Özellikle bitkiler, hasat edildikleri ve depolandıkları zamanlar da dahil olmak üzere, tohumdan itibaren büyümelerinin tüm aşamalarında, önemli hasar ve kayıplara neden olan birçok bitki zararlısının saldırısına karşı hassastır. Böcekleri, patojenleri ve yabani otları içeren bu zararlıların, dünya genelinde başlıca ürünlerin üretiminde %27-42 oranında kayıplara neden olduğu tahmin edilmektedir (Glare ve diğ., 2016).

Dünyada en çok yetiştirilen ve tüketilen sebzelerden biri domates (*Solanum lycopersicum* L.) tir. Domates bir çok vitamin, mineral, kareotenoid ve fitokimyasal madde içerdiğinden sağlıklı beslnmenin bir parçasıdır (Chaudhary ve diğ., 2018). Domateste fungus, bakteri, virüs, viroid gibi bitki patojenlerinin yol açtığı hastalıklar verim kayıplarında artış sağlamaktadır (Cemen ve diğ., 2018).

Ülkemizde domateste görülen bakteriyel hastalık etmenleri içerisinde en önemlileri *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringae pv. tomato* ve *Xanthomonas spp*. türleridir. Bakteriler, domatesin yaprak, çiçek, gövde, meyve gibi tüm toprak üstü kısımlarında hastalık oluşturabilmektedir. Ayrıca bakterilerin tohuma yerleşmesi nedeniyle hastalıklar farklı alanlara enfekteli tohum veya fide kullanımıyla yayılmaktadır. Bu hastalıklarla mücadele yöntemlerinden biri tohum üretimi sırasında patojen bakterilerin bulaşmasını önlemektir. Eğer ticari fideliklerde bakteriyel hastalık varsa tohum uygulamalarını kullanmak ve toprak üstü aksamların ilaçlanması önem kazanmaktadır. Ayrıca bitkinin hastalıklara karşı dayanıklılığını arttırmak da bir mücadele stratejisidir (Farimaz ve diğ., 2014).

Ülkemizde ve özellikle salçalık domateste önemli bir yere sahip olan ilimizde oldukça önemli bir yere sahip domates üretiminde, tohum patojenlerine karşı etkili doğal

antimikrobiyal formülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Geliştirilen bu formülasyonların özellikle tohum kaplama şeklinde uygulanması; toprak ve su kirliliğinin önüne geçilmesi, insan sağlığına etki eden kalıntılar oluşturulmaması ve hastalık etmenlerine spesifik bir mücadele yöntemi olması açısından büyük avantaj sağlamaktadır (Erler, 2000; Karabüyük ve Aysan, 2019).

Juglon, ceviz ağaçlarının köklerinde, yapraklarında, fındık kabuklarında ve odunlarında bulunan bir tür doğal naftokinondur. Önceki çalışmalar juglon ve türevlerinin hemostatik, antibakteriyel, antiviral ve prooksidasyon etkilerine sahip olduğunu göstermiştir (Tang ve diğ., 2022). Juglonun tarımda kullanımının bir çok avantajı bulunsa da; juglonun suda çözünmemesi, kolay oksidasyonu, kısa biyolojik yarı ömrü ve zayıf biyoyararlanımı gibi dezavantajlarından dolayı da, juglon taşıyıcı bir sistem kullanılarak uygulanmalıdır (Zhao ve diğ., 2016). Biyouyumluluğu ile bilinen lipozomlar bu taşıyıcı sistemlerden birisidir.

Lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir veya daha fazla fosfolipid çift tabakadan oluşan, toksik olmayan konsantrik veziküllerdir (Teixeira ve diğ., 2017). Fosfolipid moleküllerinin amfifilik karakteri, lipozomlara hem hidrofilik hem de lipofilik bileşikleri kapsülleme yeteneği sunar. Buna karşılık, fosfolipidlerin oksidasyonu ve hidrolizi gibi sorunlar, kapsüllenmiş aktif bileşenin sızmasına ve veziküllerin agregasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca, lipofilik bileşiklerin hapsedilmesi lipid çift tabakalarının iç hidrokarbon zincirleriyle sınırlıdır ve bu nedenle lipozomlardan hızla salınabilir (Baldim ve diğ., 2022). Öte yandan siklodekstrinler (CD'ler), zayıf moleküller arası etkileşimler kurma ve hem katı hem de sulu halde lipofilik bileşiklerin çözünürlüğünü artırma yetenekleri nedeniyle çok çeşitli moleküllerle inklüzyon kompleksleri oluşturmak için uygundur (Wadhwa ve diğ., 2017).

1.2 Tezin Amacı

Bitki patojenleri ile mücadele etmek için antibakteriyel özelliklere sahip bir biyopestisit geliştirilmesi hedefiyle önerilen bu tez çalışmasında;

- Literatürde antimikrobiyal özellikleri bilinen juglon molekülünün, hidrofilik bir oligosakkarit olan β-siklodekstrin ile inklüzyon komplekslerinin oluşturulması,

- Oluşturulan bu inklüzyon komplekslerinin lipozomlara enkapsülasyonu,
- Elde edilen formülasyonların ZetaSizer kullanılarak boyut, PDI ve Zeta potansiyel değerlerinin ölçülmesi, Fourier-Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometri (FT-IR) ile fizikokimyasal, Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile morfolojik karakterizasyonlarının yapılması,
- Diyaliz yöntemi kullanılarak zamana bağlı *in vitro* kümülatif salımının incelenmesi,
- Domatesten izole edilmiş olan bitki patojenlerinden; gram negatif *Pseudomonas syringae pv. tomato*, ve *Xanthomonas euvesicatoria*; gram pozitif *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* suşları kullanılarak "Agar Disk Difüzyon Testi" ve "Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Testi" ile antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi,
- Antibakteriyel aktivitesi gözlemlendiği takdirde formülasyonların tohum çimlenmesi üzerine etkisinin belirlenmesi için H-2274 ticari domates tohumları üzerinde "Tohum Çimlenme Testi" yapılması amaçlanmaktadır.

1.3 Hipotez

Antibakteriyel aktivitesi literatürde belirlenmiş olan juglon molekülü, β-siklodekstrin ile inklüzyon kompleksi haline getirildiğinde ve bu kompleks lipozoma enkapsüle edildiğinde domates patojenleri olan *Pseudomonas syringae pv. tomato*, *Xanthomonas euvesicatoria* ve *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* üzerindeki antibakteriyel etkisi serbest juglona göre artabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Domates (*Solanum lycopersicum* L.)

Kökeni And Dağları olan domates (*Solanum lycopersicum* L.), ilk kez 16. yüzyılda Avrupa'ya ithal edilmiştir. Botanik açısından domates 2n = 24 kromozomlu diploid bir meyvedir. Günümüzde bu bitki tüm dünyada yaygın olarak kullanılan, ekonomik açıdan önemli bir üründür. Patates, patlıcan, tütün ve biber gibi ekonomik öneme sahip diğer bitkiler de dahil olmak üzere 3.000'den fazla türü içeren *Solanaceae* familyasına aittir (Gerszberg ve diğ., 2015).

Domates, yağ oranı düşük olduğu ve zararlı kolesterol içermediği için sağlıklı beslenme rejiminin bir parçası olarak kabul edilmektedir. A vitamini, askorbik asit, potasyum ve folat gibi besinler ile karotenoidler (likopen, fitoen ve β-karoten), polifenoller (flavonoidler, flavanonlar ve flavonlar) gibi fitokimyasallar da domateste önemli miktarda bulunmaktadır (Chaudhary ve diğ., 2018).

Ülkemizde 2022 yılı itibarıyla sebze üretimi toplam 32 milyon tondur ve bu üretimin ilk sırasında %41,2 (13,1 milyon ton) ile domates yer almaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre de dünya domates üretiminde, Çin ve Hindistan'dan sonra 3. sırada Türkiye gelmektedir (FAOSTAT, 2021). Dünya domates ithalatı 2022 yılı itibarıyla yaklaşık 7 milyon ton olarak gerçekleşirken, ihracatı ise 4,4 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Türkiye'de domates üretimi ise en çok Akdeniz, Marmara ve Ege bölgelerinde yapılırken, illere göre domates üretiminde ve domates ekim alanlarında ilk sırada Antalya, ikinci sırada ise Bursa yer almaktadır (TEPGE, 2023).

Domates, ülkemizde çoğunlukla plastik örtülü seralarda yetiştirilir ve bu nedenle bakteriyel hastalıklara daha çok maruz kalmaktadır. Özellikle sıcak ve nemli koşullar sağlayan bu ortamlar bakteri gelişimi için oldukça uygundur. Bu bakterilerin sebep olduğu hastalıklar ise Türkiye'de domates ticari üretimi için sürekli bir tehdit olmaya devam etmektedir (Cemen ve diğ., 2018).

2.2 Domatesteki Bakteriyel Hastalıklar

Domates bitkisinde çeşitli organları etkileyen, ürün verim ve kalitesini sınırlandıran bir dizi bakteriyel hastalık bulunabilir. Bunlar; gövde nekrozu, bakteriyel yaprak lekelenmesi, meyve lekelenmesi, meyve üst çürüklüğü, gövde ve meyvelerde sulu çürüklük, gövdelerde bakteriyel solgunluk ve kanserdir (Kolomiets ve diğ., 2017).
Bu hastalıklardan dört tanesi; bakteriyel solgunluk ve kanser (etmeni Cmm), bakteriyel benek (etmeni Pst), bakteriyel leke (etmeni *Xanthomonas* spp.) ve bakteriyel solgunluk (etmeni *Ralstonia solanacearum*) tüm dünyada domateste ciddi verim düşüşüne sebep olan en yıkıcı hastalıklardır (Y. Wang ve diğ., 2018).

2.2.1 Bakteriyel solgunluk ve kanser

Domatesin bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı, gram-pozitif patojen *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*'in (Cmm) neden olduğu ekonomik olarak yıkıcı sistemik bir iletim demeti hastalığıdır. Patojen sistemik olarak ksilemi kolonize ederek tek taraflı solgunluk, yaprak nekrozu, gövde çürüklüğü ve nihayetinde bitki ölümüne neden olur (Sen ve diğ., 2014). Bakteri, gelişmekte olan domates meyvesinin dış yüzeyine sıçrayarak kuş gözü lezyonları oluşturabilir ve bu da kontamine tohuma yol açabilir (Peritore-Galve ve diğ., 2020). Bakteriyel solgunluk ve kanserin ilk bilimsel raporu 1900'lerin başında Erwin Smith tarafından belgelenmiştir 1909'daki ilk izolasyondan bu yana, bu patojen küresel olarak tespit edilmiş ve dünya çapındaki domates yetiştiricileri için ekonomik açıdan zorlu bir sorun haline gelmiştir (Peritore-Galve ve diğ., 2021).

2.2.2 Bakteriyel solgunluk

Toprak kaynaklı bakteri *Ralstonia solanacearum* tarafından oluşturulan bakteriyel solgunluk domatesin bir diğer vasküler hastalığıdır. Dünyanın tropikal, subtropikal ve bazı sıcak bölgelerinde ağır verim kaybına neden olan en ciddi domates hastalıkları arasında yer almaktadır (Singh ve diğ., 2014). Buna ek olarak, bakterinin soğuğa toleranslı suşları da rapor edilmiştir, bu da soğuk iklim bölgelerindeki domates üretimindeki kısıtlamaları artırmaktadır (Y. Wang ve diğ., 2018).

2.2.3 Bakteriyel benek

Gram-negatif patojen *Pseudomonas syringae pv. tomato*'nun (Pst) neden olduğu bakteriyel benek, serin ve nemli ortamlarda yetiştirilen domatesin ekonomik açıdan önemli bir hastalığıdır. Bu hastalık 1930'ların başından beri bilinmesine rağmen, 1970'lerin sonuna kadar ciddi verim kayıplarına yol açmamıştır. Hastalığın tarladaki insidansı, enfekte domates bitkilerinin %15'i ile %100'ü arasında değişmekte olup, genel olarak %10-30, en kötü durumda ise %100'e varan verim azalmasına neden olmaktadır (Y. Wang ve diğ., 2018).

Bakteriyel benek, hem sofralık hem de endüstriyel domates çeşitlerini enfekte edebilmesiyle bilinmektedir. Bu hastalık, meyvelerde, yapraklarda, çiçekte ve gövdelerde kendini gösterebilir. Epifitik fazdaki bakteri hücreleri, yaprak budama ve hasat işlemlerinin yanı sıra rüzgar, dolu veya yağmur gibi çevresel etkenlerin neden olduğu stomalar veya yaralar yoluyla canlı bitki dokusuna nüfuz ederek hızla nekroze olan lekelerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Nekrotik dokular bir araya gelerek yeşil organlarda fotosentetik verim kaybına ve meyvenin pazarlanabilirliğini tehlikeye atan yara izlerinin varlığına yol açabilir. Dahası, bakteri tohumlar üzerinde yaşamını sürdürebilir ve fidelikten tarlaya kadar her domates yetiştirme aşamasında büyük bir tehdit oluşturur (Schiavi ve diğ., 2021).

2.2.4 Bakteriyel leke

Bakteriyel leke, en az dört Xanthomonas türünün neden olduğu özellikle nemli ve ıslak bölgelerde görülen ciddi bir domates hastalığıdır (Stall ve diğ., 2009). Bunlar *X. euvesicatoria* (ırk T1), *X. vesicatoria* (ırk T2), *X. perforans* (ırk T3 ve T4) ve *X. gardneri*'dir ve her grubun farklı coğrafi dağılımı vardır. Bakteriyel leke hastalığı, hem taze pazar hem de işleme domateslerini etkileyen domates üretimine yönelik en büyük tehditlerden biridir. Hastalık aynı zamanda biber ve Solanaceae familyasının diğer ürünlerinde de görülür. Enfeksiyon aşamasına ve uygun iklim koşullarına bağlı olarak, hastalık %66'ya varan verim kayıplarına neden olabilir. Ne yazık ki, bu hastalığa karşı dayanıklı ticari domates çeşitleri bulunmamaktadır (H. Wang ve diğ., 2020).

Bitkileri enfeksiyöz organizmalardan korumak için tarımda pestisitler kullanılmaktadır. Araştırmalara göre, mancozeb veya bakır hidroksit içeren fungisitler, patojen bakterilerin büyümesini, bakteriyel kanser ve bakteriyel leke gibi hastalıkların gelişimini önemli ölçüde engellemektedir (Kolomiets ve diğ., 2017).

2.3 Pestisitler

Pestisitler aktif bileşenlerine, işlevlerine ve kaynaklarına göre sınıflandırılabilir. Aktif bileşenlerine göre pestisitler; organoklorinler, propanil vb. olarak sınıflandırılır. Pestisitler yerine getirdikleri işlevleri açısından herbisitler, fungisitler, insektisitler, algisitler, rodentisitler vb. olarak sınıflandırılabilirler. Bununla birlikte, kaynaklarına göre pestisitler sentetik pestisitler ve biyopestisitler olarak sınıflandırılır (Ayilara ve diğ., 2023).

Konvansiyonel tarımda bakteriyel hastalıklar ile mücadelede tercih edilen kimyasal pestisitler; zararlı yan etkileri nedeniyle canlılar için uzun vadeli birçok tehdit ve risk oluşturmaktadır. Bunların başlıcaları; kanserler, endokrin sistem hastalıkları, üreme sistemi hastalıkları ve fetal bozukluklardır (Ali ve diğ., 2019; Kalliora ve diğ., 2018; Nicolopoulou-Stamati ve diğ., 2016; Petrakis ve diğ., 2017). Bazı pestisitlerin (karbamatlar, organofosfatlar, organoklorinler ve piretroidler) nörolojik etkileri de vardır ve Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarla bağlantılıdır (Sánchez-Santed ve diğ., 2016). Ayrıca kimyasal pestisitler biyolojik olarak bozunmadan çevrede uzun yıllar kalabilmektedirler. Ağır şekilde kimyasal pestisitlere maruz kalan topraklarda biyoçeşitlilik bozulduğundan, yetiştirilen ürünlerde besin azalması ve artan hastalık vakaları oldukça yaygındır. Ayrıca gıdalarda kalıntı bırakması beslenme güvenliği açısından istenmeyen bir durumdur (Tripathi ve diğ., 2020). Bu nedenle, bitki korumanın uzun vadede sürdürülebilir olması için alternatif yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu problemlerin üstesinden gelmek, gıda ve malzeme gereksinimlerini karşılamak, tarımsal uygulamaların üretkenliğini ve sürdürülebilirliğini arttırmak için yeni stratejiler bulunmalıdır (Kumar ve diğ., 2021).

2.3.1 Biyopestisitler

Gıdalarda tehlikeli kimyasal pestisit kalıntılarının tespit edilmesi ve gıda güvenliği bilincinin artması bazı kimyasal pestisitlerin tarımsal üretimde yasaklanmasına yol açarken, biyopestisitler özellikle organik tarımda popülerlik kazanmaktadır. Biyopestisitler; hayvanlardan, bitkilerden, alglerden ve bakteri, virüs, fungus gibi mikroorganizmalardan elde edilen, tarımsal zararlıları ve patojenleri kontrol etmek için kullanılan bileşikler veya maddelerdir (Kachhawa D, 2017). Biyopestisitlerin kullanımı, çevre dostu ve konakçıya özgü oldukları için geleneksel kimyasal pestisitlere göre açık ara daha avantajlıdır. Kimyasal pestisit direnci riskini azaltarak

biyoçeşitliliğin, hedef olmayan türlerin ve çevre sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Biyopestisitlerin önemi; etkinliklerinin yüksek olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, toksik olmaması, farklı etki biçimleri ve mevcut ham maddeler olmaları nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır (Essiedu ve diğ., 2020; Kumar ve diğ., 2021).

Tarımsal ürünler tohumdan itibaren zararlılara maruz kaldıkları için sadece gelişen bitkinin değil aynı zamanda tohumlarının da farklı uygulamalar ile korunması gerekmektedir. Bu uygulamalardan bir tanesi de tohum kaplama teknolojileridir (Pedrini ve diğ., 2017). Bu uygulama tohumların çimlenme ve çıkış performansını arttırma, ekimini kolaylaştırma, tohuma kimlik kazandırma, şekilsiz tohumların şeklinin düzeltilmesi ile tohumu hastalığa ve zararlılara karşı korumak amacıyla yapılmaktadır. Tohumdan bitkiye gelişim süreci boyunca kimyasal ürünler yerine biyolojik mücadele ile özellikle bitki patojeni mikroorganizmaların verdiği zararın önüne geçilmesi hem tohum verimi, hem çevre hem de insan sağlığı için büyük önem arz etmektedir (Afzal ve diğ., 2020).

Biyolojik mücadelede kullanılan biyopestisitler;

(1) mikrobiyal kaynaklı pestisitler (örn. bakteri, mantar, virüs, protozoa ve genetiği değiştirilmiş mikrobiyaller),

(2) bitki kaynaklı pestisitler,

(3) biyokimyasal pestisitler,

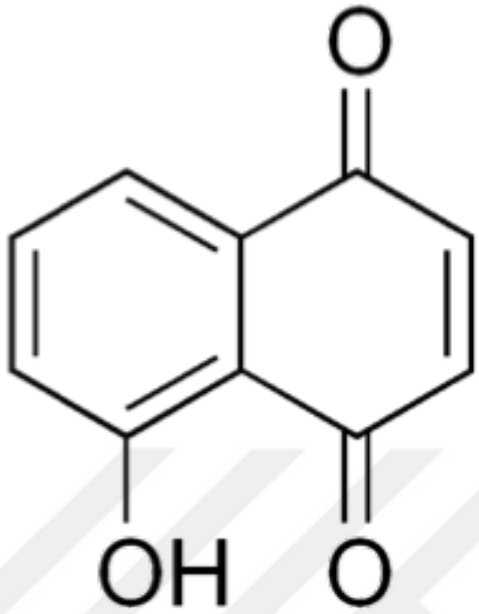
(4) agro-antibiyotikler (örn. abamektin, kasugamisin ve spinosad) ve

(5) zararlı organizmaları avlayan doğal düşmanlar olmak üzere beş kategoriye ayrılmaktadır (Liu ve diğ., 2021). Bitkiler ve mikroorganizmalar, biyoaktif bileşikleri ve antimikrobiyal ajanları yüksek oranda içermeleri nedeniyle başlıca biyopestisit kaynaklarıdır. Bitkilerdeki aktif bileşikler arasında fenoller, kinonlar, alkaloidler, steroidler, terpenler, alkoller ve saponinler bulunur (Lengai ve diğ., 2018).

2.4 Juglon

Bir naftakinon olan juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon), ceviz familyasındaki (Juglandaceae) ağaçlardan rizosfere salındığında allelokimyasal olarak işlev gören kinoid bir bileşiktir (Şekil 2.1). Juglon; *Juglans nigra* (siyah ceviz), *Juglans regia* (İngiliz cevizi), *Juglans cinerea*, *Juglans ailantifolia*, *Juglans mandshurica* dahil olmak üzere birkaç Juglandaceae üyesinden izole edilmiştir. İlk kez 1928'de juglonun

ceviz ağaçlarının fitotoksisitesinden sorumlu bileşik olduğu belirlenmiştir (Islam ve Widhalm, 2020).



Şekil 2.1 : Juglonun kimyasal yapısı.

Literatürde juglonun; antimikrobiyal (Arasoglu ve diğ., 2017), antifungal (Arasoglu ve diğ., 2016a), antiparaziter (Rani ve diğ., 2022) ve insektisit (Altuntaş ve diğ., 2020) özelliklerde olduğuna, doza bağlı olarak hayvan hücreleri üzerinde sitotoksik ve mutajenik (Erisen ve diğ., 2020) etkilere sahip olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Juglonun toksisitesi, alınan bitki türleri, salınan ve birikmiş miktar, toprak pH'sı, doku ve organik madde içeriği gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Juglon, bitki zararlılarını kontrol etmek için halihazırda kullanılan geleneksel pestisitlere karşı doğal ürün bazlı alternatifler geliştirmek için güçlü bir adaydır. Bu sebeple, juglonun tarımsal uygulamalarda kullanımının araştırılması ve iyileştirilmesi önem arz etmektedir (Islam ve Widhalm, 2020).

Literatürde yapılan bir çalışmada juglonun; bitkilerde ateş yanıklığı hastalığına sebep olan *Erwinia amylovora* patojenine karşı etkili bakterisit özelliği olduğu, aşılanmış elma çiçekleri (*Malus domestica*) ile yapılan in vitro testlerde, enfeksiyonu önlemede %67'lik bir etkinlik gösterdiği ve iki yıllık bahçe testlemelerinde çiçeklenme sırasında hastalıkla enfekteli elma ağaçları üzerinde %40 ila %82 arasında değişen derecelerde etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Fischer ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada ise kivide bakteriyel kansere sebep olan *Pseudomonas syringae pv. actinidiae* patojeni

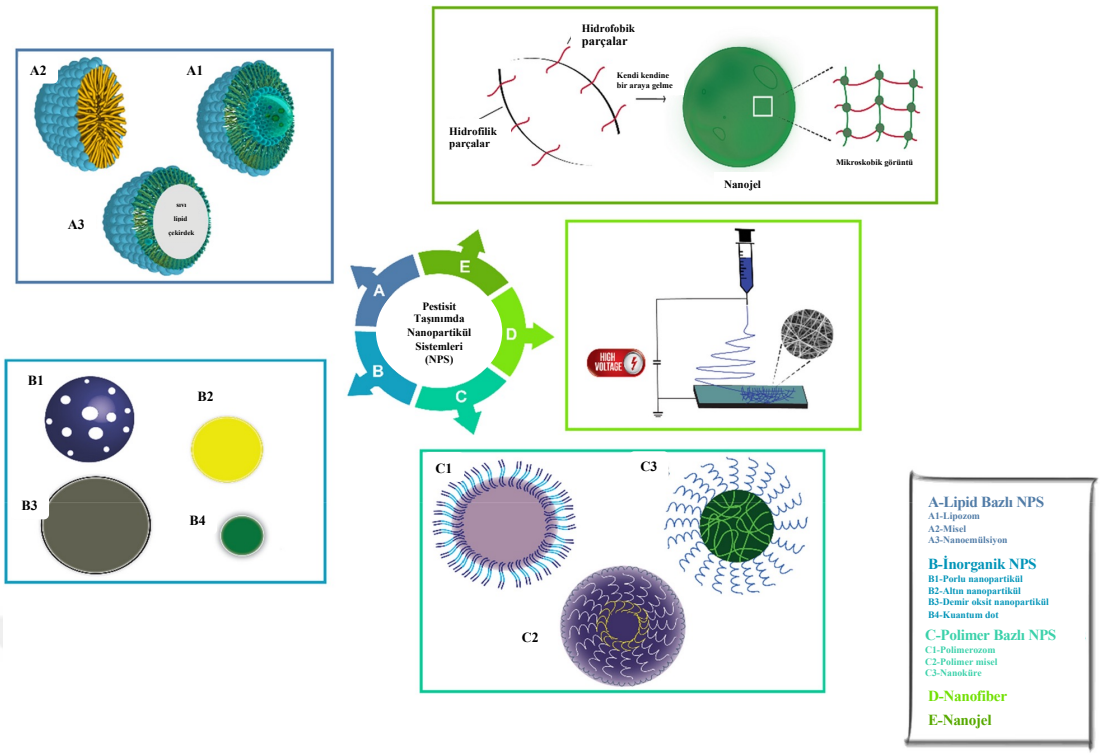
üzerine uygulanan juglonun (20 µg/ml), bakteri hücre zarı geçirgenliğini ve bütünlüğünü önemli ölçüde bozduğu, anormal hücre içi oksidatif strese neden olduğu ve gen ekspresyon bozukluklarına neden olarak bakterisit etki yaptığı gösterilmiştir (Han, Feng, ve diğ., 2021). Literatürde juglonun *Pseudomonas aeruginos*a (Han, Yan, ve diğ. 2021), *Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae* (Pereira ve diğ. 2007), *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* (Daniel Teoh Chuan ve diğ. 2012) gibi insan patojenleri üzerinde antibakteriyel etkinlikleri ile ilgili çalışmalar mevcut olsa da hâlihazırda bitki patojenleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Domates bakteriyel hastalıklarına karşı ise juglonun kullanımı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tarımda juglon kullanımının daha önce bahsedildiği gibi avantajları bulunsa da; juglonun suda çözünmemesi, havada kolay oksidasyonu, kısa biyolojik yarı ömrü ve zayıf biyoyararlanımı gibi dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar onun tarımda ve endüstride kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, juglonun dağıtımı için nano-taşıyıcıların kullanılması, belirtilen sınırlamaların üstesinden gelmek için seçilebilecek bir stratejidir (Zhao ve diğ., 2016).

Aspergillus flavus, *Candida albicans* ve *Fusarium* spp. fungusları üzerine yapılan bir çalışmada, PLGA polimerinden oluşturulan nanopartiküllere enkapsüle edilmiş juglonun, serbest juglona kıyasla antifungal aktivitesinin iyileştiği gözlemlenmiştir (Arasoglu ve diğ., 2016a).

2.5 Pestisit Taşıyıcı Sistemler

Nanobiyopestisitler, nanomalzemelerden formüle edilen, pestisitlerin etkinliğini artırmak ve çevresel yükünü azaltmak için nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen biyolojik koruma ürünleri olarak tanımlanabilir. Tarımsal kimyasal bileşenleri taşımak için kullanılan iki veya üç boyutlu nano yapılardır ve suda çözünürlüğü, biyoyararlanımı artırmaya ve tarımsal kimyasalları çevresel bozulmaya karşı korumaya yardımcı olurlar (Ayilara ve diğ., 2023). Pestisit taşımada; nano-emülsiyonlar, enkapsülasyonlar, veziküller, jeller, lifler vb. gibi bir farklı bazda ve yapıda bir çok nano formülasyon çalışması yapılmaktadır (Abdollahdokht ve diğ., 2022). Şekil 2.2’ de bunların bazı örnekleri gösterilmektedir.



Şekil 2.2 : Pestisit taşınımında kullanılan bazı nanopartiküller: a) lipid bazlı nanopartiküller, b) inorganik nanopartiküller, c) polimer bazlı nanopartiküller, d) nanofiberler, e) nanojeller (Abdollahdokht ve diğ., 2022).

Nanomalzemelerin kullanımına yönelik çalışmalar, tarım ve gıda endüstrisi alanlarında yaygın olarak yürütülmektedir. Bunların bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkisi, nanomalzemelerin konsantrasyonuna, bileşimine, boyutuna ve çeşitli önemli fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak büyük ölçüde farklılık gösterir ve bu özellikler, istenen zararlının hedef bölgesinde daha iyi etkileşim ve daha fazla seçicilik sağlar (Yadav ve diğ., 2020).

2.5.1 Nanoemülsiyonlar

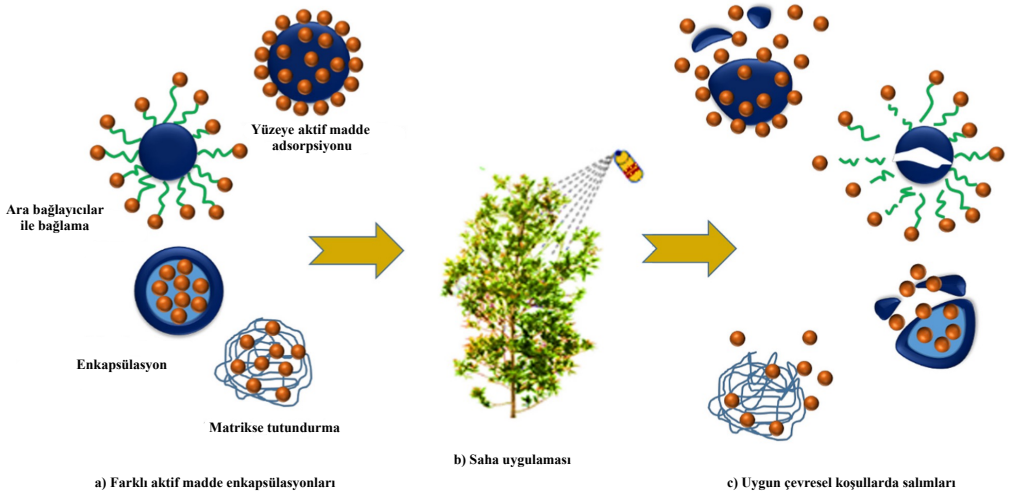
Nanoemülsiyonlar, yüzey aktif maddelerin yağ ve suyu stabilize etmesi ile oluşturulan iki fazlı bir dispersiyon sistemidir. Aktif madde ya yağ fazında ya da su fazında çözünmüş olarak bulunur (yağ içinde su W/O, su içinde yağ (O/W). Nanometre boyutundaki damlacıklar (~ 20-200 nm) bu sistemi kinetik olarak kararlı hale getirir ve ona şeffaf veya yarı saydam bir görünüm verir. Birçok pestisit suda düşük çözünürlüğe sahip oldukça hidrofobik moleküllerdir ve bu nedenle bunları gerekli etki alanına ulaştırmak zordur. Pestisitlerin nanoemülsiyonu, suda az çözünen pestisitleri küçük yağ damlacıkları halinde çözebilen ve biyoyararlanımlarını ve etkinliklerini

büyük ölçüde artırabilen bir su içinde yağ (O/W) dispersiyonudur (Feng ve diğ., 2018; Y. Singh ve diğ., 2017).

2.5.2 Nanoenkapsülasyonlar ve nanopartiküller

Pestisitlerin nanenkapsülasyonu, aktif maddenin çeşitli nanomalzemeler içinde kapsüllendiği ve kontrollü bir şekilde salındığı bir dağıtım yöntemidir. Nanomalzemelerle enkapsülasyon, bu maddeleri erken bozunmadan (örn. fotoliz, hidroliz, biyolojik bozunma, vb.), sızıntı ve buharlaşma yoluyla gereksiz kayıplardan koruyabilir ve geleneksel pestisit formülasyonlarından daha etkili bir hale getirebilir (Vurro ve diğ., 2019). Farklı malzemeler ve tasarımlar kullanılarak bu sistemin sürekli bir salım davranışı sergilemesi ve hassas bir kontrol için uyarana duyarlı bir salım özelliğine sahip olması sağlanabilir (S. Kumar ve diğ., 2019; Zhao ve diğ., 2018).

Organik malzemeler (örneğin sentetik ve doğal polimerler, lipitler, bitki kaynaklı nanopartiküller, vb) ve inorganik malzemeler (örneğin silika, karbon, kalsiyum ve kil bazlı nanopartiküller, vb) dahil olmak üzere çeşitli nanomalzemeler pestisitlerin enkapsülasyonu için kullanılmıştır. Kovalent bağlanma, elektrostatik etkileşimler ve birleştirme gibi yollarla oluşturulabilen bu sistemler pestisitlerin biyoyararlanımının artmasına ve daha uzun etkili kullanım ömrüne yol açar (Cai ve diğ., 2020; Cao ve diğ., 2018; Chariou ve diğ., 2019; De Oliveira ve diğ., 2015; Pang ve diğ., 2019).



Şekil 2.3 : Nanomalzemeler ile aktif bileşenler arasındaki etkileşimlerin şematik gösterimi: (a) Farklı kapsülasyon yöntemleri (b) pestisit nanoformülasyonlarının saha uygulaması ve (c) çeşitli çevresel koşullar altında nanoformülasyonlardan ilaç salımı (S. Kumar ve diğ., 2019).

2.5.3 Nanojeller

Nanojeller, nanoskopik ilaç taşıyıcıları olarak biyoaktif aracıların zaman kontrollü veya bölgeye özgü bir şekilde iletilmesi için kullanılmaktadır. Nanojelleri oluşturmak için Van der Waals kuvvetleri veya kovalent bağlar kullanılarak hidrofilik polimerler çapraz bağlanır ve yüksek hacimlerde su emebilir. Literatürde, pestisit özelliği gösteren uçucu yağların ve feromonların taşıyıcısı olarak nanojeller üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Abreu ve diğ., 2012; Bhagat ve diğ., 2013).

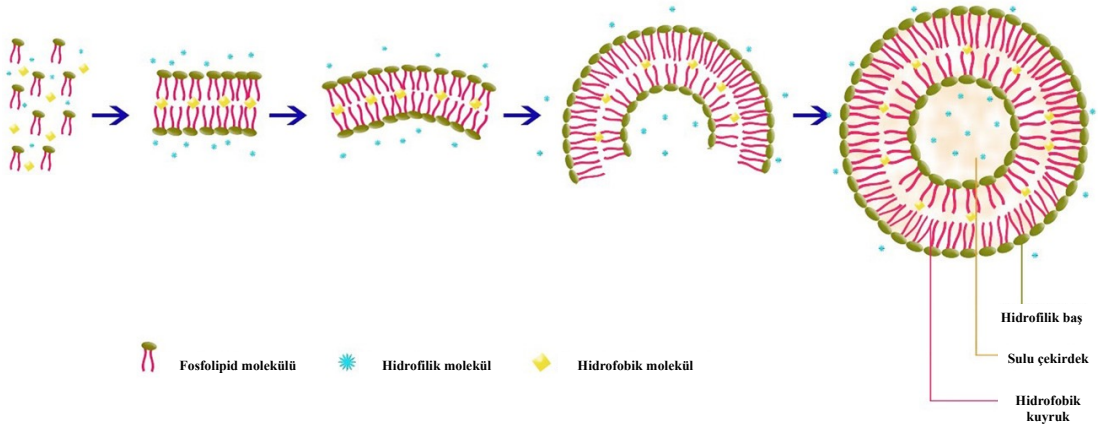
2.5.4 Lipozomlar

İlk ilaç taşıyıcı enkapsülasyon tekniklerinden biri olan lipozomlar, hem hidrofobik hem de hidrofilik biyoaktif molekülleri taşıyabilecek özelliklere sahiptirler. Çünkü lipozomda sulu bir çekirdek, bir lipit çift tabakası tarafından tutulmaktadır. Doğal/sentetik lipit, biyoaktif molekül, katkı maddeleri ve yüzey modifikasyon kısımlarından oluşabilen bu nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak mükemmel avantajlar gösterirler. Lipit çift tabaka, taşınan molekülü fizyolojik ortamlarda erozyondan korumaktadır. Nano boyut, iyi stabilite ve çok işlevli özellikleri, kontrol edilebilir ilaç salımı sağlamaktadır. Doğal lipit iyi bir biyouyumluluğa sahiptir. Ayrıca, lipit membran, endositoz yoluyla hücre alımını teşvik eder ve biyoyararlanımın iyileştirilmesine katkı sağlar (Cheng ve diğ., 2022).

2.5.4.1 Lipozomların oluşum mekanizması

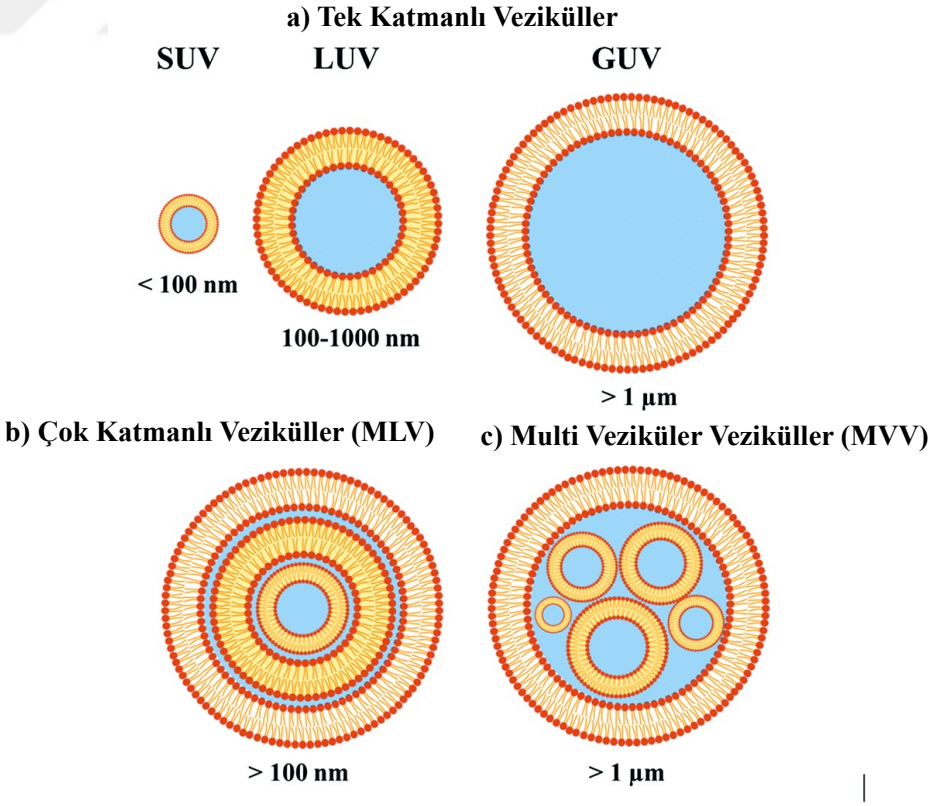
Lipozomal veziküller fosfolipid hidrasyonu ile hazırlanır. Yapısal olarak fosfolipidler, hidrofilik bir baş grup ve hidrofobik açil zincirleri ile doğada amfifilik olarak bulunurlar. Bu özellik fosfolipidlerin etkili ve kolay bir şekilde hidrasyonunu sağlar (Şekil 2.4). Sulu fazda, fosfolipid molekülleri, lipofilik zincirlerin su içermeyen bir alan oluşturmak için birbirlerine baktığı, hidrofilik gruplarının ise akuafilik bir alan oluşturmak için birleştiği iki katmanlı bir yapıda yeniden bir araya gelir. Mekanik çalkalama veya ısıtma sırasında fosfolipid çift katmanlar sulu ortamı çevreleyerek veziküller oluşturur. Bu yapı, hidrofobik ve hidrofilik maddelerin lipid çift tabakası içinde veya sulu çekirdek içinde hapsedilmesine yardımcı olur. Lipozom hazırlamada, fosfolipidlerin faz geçiş sıcaklığı (Tt) kritik bir faktördür. Tt'nin üzerinde fosfolipidler, fosfolipidlerin hidrofobik kuyruklarının lipozom oluşturmaya hazır olduğu sıvı kristal fazda görünür. Sıcaklık Tt'nin altına düşerse, fosfolipidler lipozom oluşumunu

mümkün kılmayan jel halinde görünür, çünkü hidrofobik kuyruklar bu koşulda sıkıca paketlenmiştir (Ajeeshkumar ve diğ., 2021; Alavi ve diğ., 2017).



Şekil 2.4 : Lipozom yapısı ve oluşumu (Ajeeshkumar ve diğ., 2021).

Lipozomlar Şekil 2.5'te gösterildiği gibi fosfolipid çift katman sayısına göre küçük tek katmanlı veziküller (SUV), büyük tek katmanlı veziküller (LUV), dev tek katmanlı veziküller (GUV), çok katmanlı veziküller (MLV) ve multivesiküler veziküller (MVV) olarak sınıflandırılır.



Şekil 2.5 : Lipozomların sınıflandırılması (Jash ve diğ., 2021).

Parçacık boyutlarıyla birlikte çeşitli lipozom türleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Lipozomların boyutu, lipozomların ve lipozomların içine enkapsüle edilen aktif bileşenlerin farmakokinetiği üzerinde önemli bir etki gösterir (Andra ve diğ., 2022).

Çizelge 2.1 : Lipozom türleri ve partikül boyutları (Andra ve diğ., 2022).

Lipozom çeşidi	Partikül boyutu	Katman sayısı
Küçük tek katmanlı veziküller (SUV)	20-100 nm	1
Büyük tek katmanlı veziküller (LUV)	> 100 nm	1
Dev tek katmanlı veziküller (GUV)	> 1000 nm	1
Çok katmanlı veziküller (MLV)	> 500 nm	> 5
Muktiveziküler veziküller (MVV)	> 1000 nm	1

Tek katmanlı lipozomlarda vezikül, sulu çözeltiyi çevreleyen tek bir fosfolipid çift katmanlı küreye sahiptir. Çok katmanlı lipozomlarda veziküller soğan yapısına sahiptir. Klasik olarak, birkaç tek katmanlı vezikül diğerinin içinde daha küçük boyutta olacak şekilde su katmanlarıyla ayrılmış konsantrik fosfolipid kürelerinden oluşan multilamellar bir yapı meydana gelir (Akbarzadeh ve diğ., 2013).

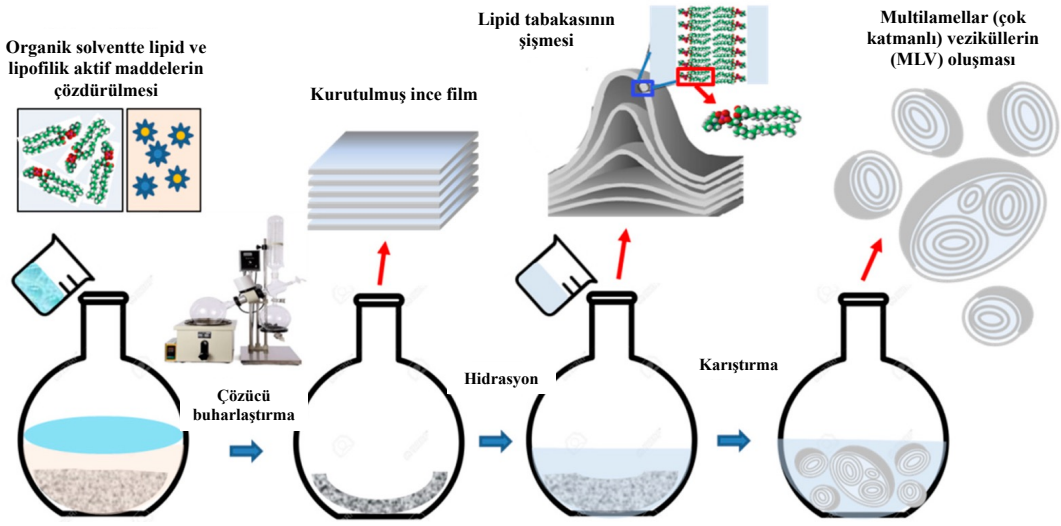
2.5.4.2 Lipozom hazırlama yöntemleri

Lipozom nanoformülasyonu oluşturmaya yönelik bir yöntemin ana hedefleri, monodispers partiküllerin (dar bir boyut dağılımına sahip) oluşumu ve istenen lamellarite derecesinin sağlanması, etkili ilaç yüklemesi ve ürünlerin uzun vadeli kolloidal stabilitesidir.

İnce film hidrasyon yöntemi

İnce film hidrasyon tekniği (Bangham yöntemi olarak da bilinir) MLV'lerin hazırlanmasında kullanılan en eski ve en yaygın yöntemdir. Homojen bir karışım sağlamak için ana fosfolipid bileşenleri organik bir çözücüde (diklorometan, kloroform, etanol vb.) çözülür. Daha sonra, 45-60 °C sıcaklıkta vakum pompası altında buharlaştırma ile organik çözücünün uzaklaştırılması sağlanır. Organik çözücünün uzaklaştırılmasından sonra homojen, kuru, ince lipit bir film (istiflenmiş iki tabakalı) oluşur. Son aşama, farmasötik formülasyon için basit distile su çözeltisi veya pH 7,4'te

normal (fosfat) salin tamponundan oluşabilen uygun bir sulu ortam kullanılarak lipit filmin hidrasyonundan oluşur. Hidrasyon işlemi (1-2 saat süreli) genellikle 60-70 °C sıcaklıkta ve her durumda bileşen lipitlerin faz geçiş sıcaklığının üzerinde gerçekleştirilir. Hidrasyon aşaması sırasında lipid şişer ve hidratlanır, bu da boyut ve lameller bakımından oldukça heterojen bir MLV süspansiyonunun oluşmasına neden olur (Şekil 2.6) (Lombardo ve Kiselev, 2022; Zhang, 2017). Lipozom sistemlerine ilaç yüklemesiyle ilgili olarak, lipofilik maddeler ince film oluşumundan önce fosfolipid karışımıyla çözülebilirken, hidrofilik maddeler hidrasyon işlemi sırasında lipozoma (pasif olarak) dahil edilebilir (Xiang ve Cao, 2018). Oluşum sürecinin sonraki adımı, lipozomların boyutunun ve lamellaritesinin azaltılmasından oluşur. Bangham yönteminin başlıca dezavantajları organik çözücünün uzaklaştırılmasının zorluğu, düşük hapsetme etkinliği ve küçük ölçekli üretimdir. (Lombardo ve Kiselev, 2022).



Şekil 2.6 : İnce film hidrasyon yöntemi (Lombardo ve Kiselev, 2022).

Etanol/eter enjeksiyon yöntemi

Etanol/eter enjeksiyon yöntemlerinde, lipidler organik bir çözücüde (dietil eter, eter-metanol karışımı veya etanol) çözdürülür. Ardından bu çözelti 55-65ºC'de veya düşük basınç altında sulu faza enjekte edilerek lipozom elde edilir. Daha sonra, hazırlanan lipozomlardan organik çözücüler buharlaştırılır. Bu yöntemin başlıca dezavantajları arasında arasında uzaklaştırılması gereken bir solvent kullanımı ve nispeten daha polidispers bir dağılımın (özellikle eter enjeksiyonu için) oluşması yer almaktadır. Enjeksiyon metodunun modern yöntemi olarak inkjet yöntemini geliştirmiştir (Andra ve diğ., 2022; Dymek ve Sikora, 2022).

Emülsifikasyon Yöntemi

Emülsifikasyon yöntemi enjeksiyon yöntemlerine benzer. Lipitler organik çözücü içinde çözülür ve ardından hem organik hem de su fazları birbirine karıştırılır. Bununla birlikte, enjeksiyon yönteminin aksine, organik faza daha az miktarda su fazı eklenir. Ayrıca, organik faz kısa bir süre sonra uzaklaştırılmaz, bunun yerine organik fazda bir su emülsiyonu oluşur. Lipidler su damlacıklarının etrafında tek bir tabaka oluşturur ve ardından organik çözücü buharlaştırılır. Organik çözücünün buharlaşmasıyla birlikte su partiküllerinin etrafında lipozomlar oluşur. Emülsifikasyon yönteminin en büyük artısı, enjeksiyon yöntemlerine kıyasla daha yüksek kapsülleme verimliliği sağlamasıdır. Emülsifikasyon yönteminin bilinen birçok farklı versiyonu arasında ters fazlı buharlaştırma en temel olanlardan biridir (G. Chen ve diğ., 2014; Šturm ve Ulrih, 2021).

Deterjan giderme yöntemi

Deterjan giderme yöntemi, genellikle tek katmanlı lipozomların elde edilmesini sağlar. İşlemin ilk aşamasında lipidler ve yüzey aktif maddelerden (sodyum kolat veya sodyum dodesil sülfat gibi) oluşan karışık miseller elde edilir. Yüzey aktif maddeler hem hidrasyon aşamasında (sulu çözeltide) hem de kurutulmuş bir lipid karışımının hazırlanmasında eklenebilir. Çözücünün karışık misellerden uzaklaştırılması LUV oluşumuna yol açar. Bu amaçla seyreltme, diyaliz veya jel filtrasyon kromatografisigibi teknikler kullanılabilir. Deterjan uzaklaştırma yöntemi, lipozomların kullanılan yüzey aktif maddelerle kontaminasyonu, biyomakromoleküllerin denatürasyon olasılığı veya deterjan uzaklaştırma aşamasında ilaç sızıntısının neden olduğu enkapsülasyon etkinliğinin azalması gibi bazı dezavantajlar göstermektedir (Dymek ve Sikora, 2022).

Sonikasyon yöntemi

Sonikasyon, lipozomların hazırlanması için basit ve yagın olarak kullanılan bir yöntemdir. Sonikasyon enerjisi, büyük, MLV'leri ve agregatları daha küçük tek katmanlı lipozomlara ayırmak için kullanılır. Uygulama süresi ve basınç dalgalarının yoğunluğu, hazırlanan veziküllerin boyutunu belirleyen anahtar parametrelerdir. Ultrasonikasyon, emülsiyonların hazırlanması için ultrason dalgalarını kullanan ve emülsiyonların fiziksel özellikleri üzerinde daha iyi kontrole sahip olan yeşil teknolojilerden biridir. Boyut küçültme etkisine, ortamdaki mikro kabarcıkların/boşlukların oluşumu, büyümesi ve patlayarak çökmesini içeren kavitasyon olayları aracılık eder. Küçük kabarcıklar büyüyerek mümkün olan

maksimum boyuta ulaşır ve hızla çökerek yüksek enerji açığa çıkarır. Açığa çıkan enerji yüksek basınçlı ve yüksek hızlı sıvı jetleri oluşturur. Bu olaylar sıvı boyunca oluşacak ve parçacıklar arasındaki şiddetli çarpışmalardan sorumlu olacaktır (Ajeeshkumar ve diğ., 2021).

Prob sonikasyonu ve banyo sonikasyonu iki ana sonikasyon yöntemidir. Her iki sonikasyon yöntemi de benzer özelliklere sahip lipozomlar üretir. Bununla birlikte, banyo sonikasyonu operasyonel parametrelerin düzenlenmesi açısından daha üstündür (Dymek ve Sikora, 2022).

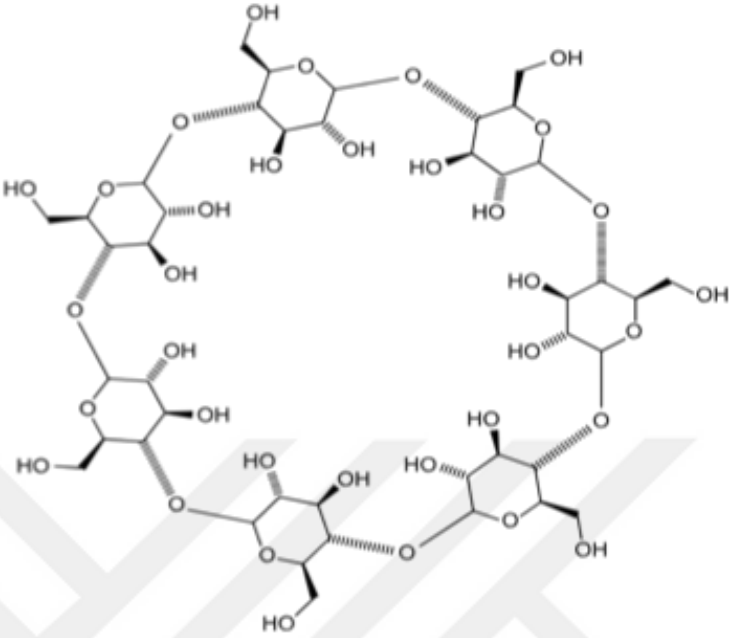
Yukarıda anlatılan bir çok avantajından dolayı, juglonun enkapsülasyonu için lipozom kullanımının, toksisite gibi yan etkilerini azaltarak, biyoyararlanımı arttırması açısından etkili bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlanan juglon yüklü lipozomların, farmakokinetik ve biyolojik dağılım özelliklerini önemli ölçüde geliştirerek plazma yarı ömründe artış ve tümörlü bölgede daha yüksek birikim sağladığı, azaltılmış toksisite profilleri ve *in vivo* melanom modeline karşı önemli ölçüde daha iyi antikanser etkinliği olduğu gözlemlenmiştir (Aithal ve diğ., 2011). Başka bir çalışmada juglon-nanolipozomların *Echinococcus granulosus* protoskoleksleri üzerinde güçlü bir skolisidal etkiye sahip olduğu ve juglon-nanolipozomlarla tedavi edilen protoskolekslerin, sadece juglon ile tedavi edilen protoskolekslere karşı daha yüksek apoptotik aktivite sergilediğini belirtilmiştir (Moghadaszadeh ve diğ., 2021).

Lipozomlar genellikle doğal, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik ve immünojenik olmayan lipid moleküllerinden yapılmaktadır. Lipozomal formülasyonların etkinliğini iyileştirmek için araştırmacılar, moleküller arası zayıf etkileşimler oluşturma, hem katı hem de sulu halde lipofilik bileşiklerin çözünürlüğünü arttırma ve çok çeşitli moleküllerle inklüzyon kompleksleri oluşturma yeteneklerinden dolayı, siklodekstrinleri kullanmaktadırlar (Baldim ve diğ., 2022).

2.5.5 Siklodekstrinler

Siklodekstrinler (CD'ler), glukopiranoz birimleri tarafından oluşturulan siklik oligosakkaritlerdir. Sahip oldukları glikoz birimlerinin sayısına göre α-CD, β-CD ve γ-CD olarak adlandırılırlar. Kristalimsi, homojen ve higroskopik olmayan maddelerdir. Dış yüzeyleri hidrofilik iken iç boşlukları nispeten hidrofobiktir. Sonuç olarak, CD'ler, pek çok az çözünür ilaçla suda çözünebilen inklüzyon kompleksleri oluşturma yeteneğine sahiptir ve böylece biyoyararlanımlarını arttırır. Ayrıca, CD

inklüzyon kompleksleri ilaçların fiziksel ve termal kararlılığını iyileştirmekte ve toksik etkilerini sınırlandırmaktadır (Gharib ve diğ., 2015). Üç ana CD türü arasında en yaygın olarak kullanılanı, β-CD'dir (Şekil 2.2) (Jiang ve diğ., 2019).



Şekil 2.7 : β-siklodekstrinin kimyasal yapısı.

Lipozomların sulu çekirdeğinde CD'lerin varlığı, lipozomların özelliklerini etkilemeden zarın bütünlüğünü korumaktadır. Bu nedenle lipozomlara enkapsüle edilmiş ilaç/siklodekstrin kompleksleri, kontrollü ilaç salımı sağlamada hem siklodekstrinlerin hem de lipozomların avantajlarını bir araya getiren etkili bir yaklaşımdır (Gharib ve diğ., 2015).

Lira ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, lipozomlara yüklenmiş usnik asit/β-siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin, usnik asitin suda çözünürlüğünü arttırarak biyoyararlanımını iyileştirdiğini, formülasyonun süspansiyon formunda aylarca stabilitesini koruduğunu, ilaç salımının sadece usnik asit yüklü lipozomlara ve usnik asit/β-CD inklüzyon kompleksine göre iyileştiğini bulmuşlardır (Lira ve diğ., 2009).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların alındıkları firma ve kullanım amaçları Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Kullanılan kimyasal malzemeler ve bilgileri.

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Kodu	Kullanım Amacı
5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (Juglon)	Sigma-Aldrich	H47003	İnklüzyon kompleksi hazırlanması
β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich	C4767	İnklüzyon kompleksi hazırlanması
Ethanol Absolute, ≥ 99,8%	Riedel-de Haën	32221	İnklüzyon kompleksi hazırlanması
L-α-Phosphatidylcholine	Sigma-Aldrich	P3644	Lipozom hazırlanması
Dimetil sülfoksit (DMSO)	İsolab	9140362500	Juglon için çözücü
Dulbecco′s Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	D8537	Salım çalışması
Triptik Soy Agar	Merck	105458	Besiyeri hazırlanması
Triptik Soy Broth	Merck	105459	Besiyeri hazırlanması

3.1.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar ve kullanım amaçları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : Kullanılan ekipmanlar ve bilgileri.

Cihaz/Ekipman	Marka/Model	Kullanım Amacı
Hassas Terazi	Ohaus/AX224	Gerekli kimyasalların tartımı
Ultrasonik Su Banyosu	Weightlab/WF-UD2	Örneklerin çözünmesi
Vortex	Stuart/SA8	Örneklerin çözünmesi
Manyetik Karıştırıcı	Stuart/UC 152	İnklüzyon kompleksi hazırlanması

Çizelge 3.2 (devam) : Kullanılan ekipmanlar ve bilgileri.

Cihaz/Ekipman	Marka/Model	Kullanım Amacı
Santrifüj	Beckman – Coulter/Allegra X30R	İnklüzyon kompleksi hazırlanması
Prob Sonikatör	Bandelin Sonopuls/	Lipozom hazırlanması
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore/Direct-Q 3 UV	Saf suyun temini
Vortex	Stuart/SA8	Örneklerin çözünmesi
UV-Spektrofotometre	VWR /UV-1600PC	Malzeme karakterizasyonu
Zetasizer	Malvern/Zetasizer NanoZS	Malzeme karakterizasyonu
FT-IR	PerkinElmer /Spectrum Two	Malzeme karakterizasyonu
FE-SEM	ZEISS/Gemini 500	Malzeme karakterizasyonu
Liyofilizatör	Teknosem/TRST 4-4	Malzeme karakterizasyonu
Biyogüvenlik Kabini	Thermo Scientific™ Safe 2020 Class II	Antibakteriyel aktivite
Mikroplaka Okuyucu	EPOCH	Antibakteriyel aktivite
Etüv	MMM MEDCENTER/INCUCEL L55	Antibakteriyel aktivite
Otoklav	Hirayama/HV-85L	Malzeme sterilizasyonu

3.1.3 Deneylerde kullanılan patojen bakteri izolatları

Antibakteriyel testlerin gerçekleştirildiği, her biri domates tohum patojeni olan; gram negatif model organizma *Pseudomonas syringae pv. tomato* (SH-1) ve *Xanthomonas euvesicatoria* (SH-2); gram pozitif model organizma *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (SH-3) bakteri suşları Doç. Dr. Sümer HORUZ'un mikroorganizma koleksiyonundan (Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü) temin edilmiştir.

3.2 Metod

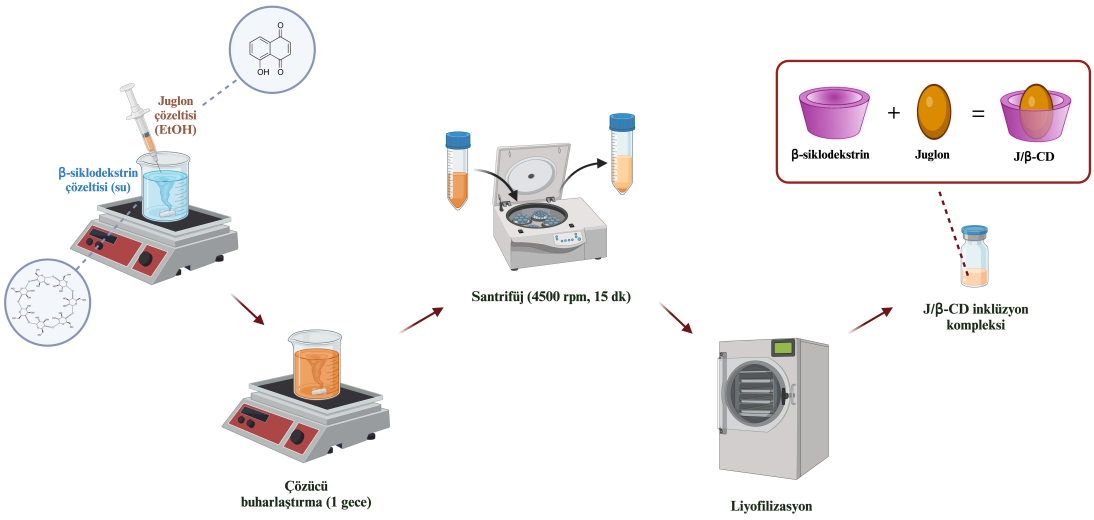
3.2.1 Juglon kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Juglonun kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için saf etanolde çözdürülen 1mg/mL konsantrasyona sahip juglon çözeltisi 0,08 mg/mL – 0,00125 mg/mL aralıklarında belirli konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Elde edilen seyreltmelerin 424 nm'de UV-spektrofotometre (VWR/UV-1600PC) kullanılarak absorbans ölçümü alınmış ve

okunan bu değerler ile absorbans-konsantrasyon doğrusu çizilmiştir. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması kullanılmıştır.

3.2.2 Juglon/β-siklodekstrin inklüzyon kompleksinin hazırlanması

Juglon/β-siklodekstrin (J/β-CD) inklüzyon kompleksleri literatürde belirtildiği gibi Mangolim ve diğ., 2014) çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle 5 mM juglon etanolde çözdürülmüş, daha sonra 5mM ultra saf suda çözdürülmüş β-siklodekstrin içerisine karıştırma altında damla damla eklenmiştir. Çözelti alkolün uçması için gece boyu karışmaya bırakılmıştır. Kompleks oluşturmayan moleküllerin ayrılması için çözelti 4500 rpm hızda 15 dakika boyunca santrifüjlenmiş, kompleksi içeren süpernatant pelletten ayrılmıştır. Ayrılan süpernatant liyofilize edilerek, elde edilen son hali oda sıcaklığında, nemsiz bir ortamda kapalı tüpte ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : Deneyin şematik gösterimi.

3.2.3 Boş lipozom ve lipozomal formülasyonların hazırlanması

Lipozom eldesi için sonikasyon metodu kullanılmıştır (Christin Ayuning Putri ve diğ., 2017). 1 gram fosfatidilkolin, 100 ml ultra saf su ile karıştırılmış (%1 a/h), buz banyosunda %70 genlikte toplam 10 dakika boyunca prob sonikatör kullanılarak sonike edilmiştir. Homojenizasyon boyunca cihaz, 1 dakika çalıştırılıp 5 saniye ara verilerek ve 5. dakikada 1 dakika ara verilerek toplamda 10 dakika boyunca çalıştırılıp lipozomlar hazırlanmıştır.

Lipozomal enkapsülasyon için istenilen ağırlıkta kurutulmuş inklüzyon kompleksi tartılarak sıvı halde bulunan lipozomlar ile 30 saniye 1000 rpm'de karıştırılmış ve lipozomal inklüzyon kompleksi (J/β-CD/L) hazırlanmıştır.

Hidrofobik bir bileşik olan juglonun β-CD inklüzyon kompleksi yapılmadan, sadece lipozom ile birleşiminin gözlemlenmesi için, farklı DMSO oranları içerisinde çözdürülen juglon, 1:1 (h/h) oranında lipozom ile karıştırılmıştır (lipozomal juglon - J/L). Hazırlanan bu örnek (J/L) karakterizasyon çalışmalarına katılmamış sadece antibakteriyel aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir.

3.2.4 Formülasyonların karakterizasyonu

3.2.4.1 Kompleksin inklüzyon oranının (İO), juglon yükleme kapasitesinin (YK) ve reaksiyon veriminin (RV) belirlenmesi

Kompleks içindeki juglon miktarlarının belirlenmesi için 1 mg kompleks tartılarak 1 mL etanol içinde çözülmüş ve homojen bir dağılım sağlamak için bir süre ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Juglon konsantrasyonu; 424 nm'de absorbans ölçümleri ile önceden oluşturulmuş juglon-etanol standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. İnklüzyon oranı (İO), juglon yükleme kapasitesi (YK) ve reaksiyon verimi (RV) (kütle yüzdesi olarak verilmiştir), sırasıyla eşitlik 3.1, 3.2 ve 3.3'te verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Acar ve diğ., 2023).

$$\text{İO}\ (\%) = \frac{\text{İnklüzyon kompleksindeki juglon miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçtaki juglon miktarı (mg)}} \times 100 \qquad (3.1)$$

$$\text{YK}(\%) = \frac{\text{İnklüzyon kompleksindeki juglon miktarı (mg)}}{\text{Üretilen toplam inklüzyon kompleksi miktarı (mg)}} \times 100 \qquad (3.2)$$

$$\text{RV}(\%) = \frac{\text{Üretilen toplam inklüzyon kompleksi miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçtaki toplam juglon ve β-CD miktarı (mg)}} \times 100 \qquad (3.3)$$

3.2.4.2 J/β-CD/L formülasyonunun enkapsülasyon etkinliğinin (EE) belirlenmesi

Lipozomal juglon/β-siklodekstrin (J/β-CD/L) formülasyonunun enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi, literatürde belirttiği şekilde santrifüj yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Jhan ve Pethe, 2020). Bunun için 5 mg/mL formülasyon 4°C'de 9000 rpm hızda 1 saat boyunca santrifüjlenmiş, enkapsüle olmayan juglonu içeren süpernatant toplanmıştır. Toplanan süpernatant 1:10 (h/h) oranında etanol ile seyreltilmiş ve UV spektrofotometre kullanılarak 424 nm'de analiz edilmiştir.
Süpernatanttaki juglon konsantrasyonu, juglon kalibrasyon eğrisi kullanılarak bulunmuştur. Lipozomlara yüklenmiş juglon miktarı ise, başlangıçta bulunan juglon miktarından yüklenmemiş juglon miktarının çıkartılması ile belirlenmiştir. % enkapsülasyon etkinliği (EE) eşitlik 3.4'te verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{EE}\ (\%) = \frac{\text{Lipozomlara yüklenmiş juglon miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçtaki juglon miktarı (mg)}} \times 100 \qquad (3.4)$$

3.2.4.3 Boyut, PDI ve zeta potansiyel analizi

Juglon/β-siklodekstrin (J/β-CD) inklüzyon kompleksinin ve lipozomal juglon/β-siklodekstrin (J/β-CD/L) formülasyonunun boyut, PDI ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dinamik ışık saçılması tekniği ile ortalama boyut ve PDI değeri belirlenirken, elektroforetik ışık saçılması tekniği ile zeta potansiyeli belirlenmiştir (Coksu ve diğ., 2024). Numuneler ölçümden önce 1:10 oranında ultra saf su ile seyreltilmiş ve ölçümler 25 °C'de üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Serbest juglon, β-siklodekstrin, juglon/β-siklodekstrin, boş lipozom ve J/β-CD/L formülasyonunun fonksiyonel gruplarının kimyasal analizi PerkinElmer Spectrum Two (PerkinElmer, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlüğünde fonksiyonel grupları ve birbirleri arasındaki etkileşimleri analiz edilmiştir (Acar ve diğ., 2023).

3.2.4.5 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Hazırlanan formülasyonların morfolojik görüntülenmesi, şekil ve boyut analizi Gemini 500 (ZEISS, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılacak görüntüleme için malzemeler sıvı halde metalik grid üzerine damlatılmış ve kuruduktan sonra STEM dedektörü ile analiz edilmiştir.

3.2.5 *In vitro* juglon salımı

Lipozomal juglon/β-siklodekstrin (J/β-CD/L) formülasyonundan *in vitro* juglon salımı diyaliz metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Lira ve diğ., 2009). Bunun için 5 mg/mL formülasyon diyaliz torbasına (selülöz membran, cut-off =14 000, Sigma-Aldrich, ABD) yerleştirilmiş, torbaların ağzı diyaliz mandalları ile kapatılmış ve 260 mL pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi içeren kaba daldırılmıştır. Salım sistemi 37±1°C'de manyetik karıştırma altında tutulmuş ve belirli zaman aralıklarında salım ortamından örnekler alınarak UV spektrofotometre yardımıyla salınan juglon içeriği ölçülmüştür. Juglonun lipozomlardan *in vitro* salım profilleri, zamanın bir fonksiyonu olarak salınan juglonun yüzdesi ile ifade edilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

3.2.6.1 İnokulum hazırlanması

Her üç bakteri kültürü için (SH-1, SH-2, SH-3) ayrı ayrı falkonlarda hazırlanan Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri içerisinde (10 mL) öze ucu ile alınan bakteri kültürleri 24 saat boyunca 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda bakteri kültürleri 0.2-0.3 OD standartına göre cam tüpler içerisinde seyreltilmiş, her biri için $1x10^8$ CFU/mL bakteri yoğunluğu elde edilmiştir.

3.2.6.2 Agar disk difüzyon testi

Hazırlanan formülasyonların disk difüzyon testi Kirby–Bauer metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Hudzicki, 2009). Bunun için öncelikle $1x10^8$ CFU/mL konsantrasyonunda hazırlanan bakteri inokulumlarından 100 µL alınarak Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri içeren petrilere ekim yapılmıştır. Ardından bakteri duyarlılık testi ölçümü için tasarlanan özel blank filtreler agarda ilgili alana yerleştirilmiştir. Elde edilen formülasyonlardan (serbest juglon, β-siklodekstrin/juglon, lipozomal β-

siklodekstrin/juglon ve lipozomal juglon) blank filtrelere 18 µL eklenmiştir. Bakteriler 25°C'de inkübasyona bırakılmış ve 48 saat sonunda, bakteri duyarlılığının bir belirteci olan zon çaplarının ölçülerek mm cinsinden kıyaslanması ile etki bakımından değerlendirilmiştir. Çalışma her bakteri suşu için 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.6.3 Minimum inhibisyon konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon testi

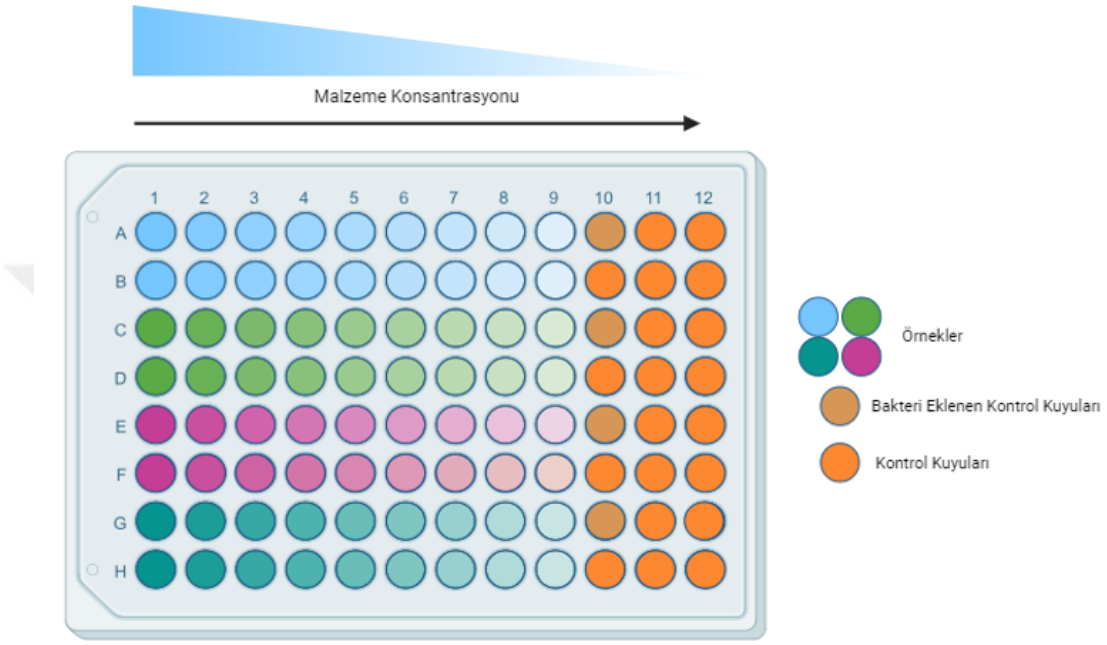
Minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) testi, klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü (CLSI) protokülüne göre (CLSI, 2018) bakteriler üzerinde %90-100 oranında gelişimi inhibe edici etkisi olması beklenen madde konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir. 96 kuyucuklu mikro plakalar üzerine (mikrodilüsyon); blank (TSB), sterilite kontrolü olarak besiyeri (TSB), bakteri üreme kontrolü, ve farklı konsantrasyonlarda araştırılacak olan formülasyonlar (serbest juglon, β-siklodekstrin/juglon, lipozomal juglon ve lipozomal β-siklodekstrin/juglon) uygulanmıştır.

Şekil 3.2'de şematik gösterimi yapılan 96 kuyucuklu mikroplakanın 1-9 arasındaki sütunları örneklerin bulunduğu kuyular, 10. sütun üreme kontrolü, 11. sütun sterilite kontrolü ve 12. sütun kör (blank) olarak belirlenmiştir. Test için ilk olarak 96 kuyucuklu mikroplakaların bütün kuyularına 100 µL sıvı besiyeri eklenmiştir. Daha sonra her sıranın ilk kuyusuna 100 µL denenmek istenen formülasyon eklenerek pipetaj yapılmış ve 100 µL çekilerek ikinci kuyuya aktarılmıştır. Bu işlem 9. kuyuya kadar tekrarlanarak örneklerin 2 kat seri dilüsyonları yapılmıştır. 9. Kuyudan çekilen 100 µL örnek iste atılmıştır. Bu sayede örneklerin azalan konsantrasyonlarının antibakteriyel etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. A, C, E, G sıralarına 10. kuyuya kadar 5 µL bakteri (10^7 CFU/mL) eklenmiş, geri kalan bütün kuyulara ise 5 µL besiyeri eklenerek son hacim her kuyuda 105 µL'ye tamamlanmıştır. Mikroplakalar 48 saat boyunca 25°C'de inkübasyona bırakılmış, süre sonunda bakteri büyümesi bulanıklık yöntemi ile görsel olarak ve 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. %90-100 oranında bakteri gelişimini inhibe eden en düşük formülasyon konsanntrasyonu "MİK" değeri olarak belirlenmiştir.

Minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi için MİK değeri ve bu değere kadar olan bütün konsantrasyonlar TSA besiyeri içeren petrilere ekilerek

bakteri büyümesi açısından değerlendirilmiştir. Bakteri üremesinin petride gözlemlenmediği en düşük konsantrasyon "MBK" değeri olarak belirlenmiştir.

Çalışmalar her bir bakteri suşu için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve konsantrasyon hesaplamaları juglonun formülasyondan salım miktarları baz alınarak yapılmıştır.



Şekil 3.2 : Mikrodilüsyon testi şematik gösterimi.

3.2.7 Tohum çimlenme testi

Tohum çimlenme testi, serbest juglon ve lipozomal β-siklodekstrin/juglon formülasyonunun çimlenmeye etkisinin gözlemlenmesi amacıyla ticari olarak satın alınmış H-2274 çeşidi domates tohumları üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak tohumların çimlenme testi öncesi yüzey dezenfeksiyonları yapılmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu için tohumlar 5 dakika boyunca %1'lik ticari çamaşır suyu (ACE %5) içerisinde bekletilmiştir. Ardından tohumlar 3 kez saf su ile yıkanıp çamaşır suyundan arındırılarak kurumaya bırakılmıştır. Dezenfeksiyon işlemi tamamlanıp tohumlar bir gece boyunca kurutulduktan sonra, MİK testinin sonuçlarına göre belirlenen konsantrasyon ile MİK'in bir alt ve bir üst değeri domates tohumları üzerinde uygulanmıştır. Ekimi yapılacak tohumlar formülasyonlar içerisinde 20 dakika süreyle çalkalanmış, ardından çıkartılıp 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Formülasyonların uygulandığı tohumlar; steril kabinde, aseptik koşullar içerisinde, üst üste iki adet steril

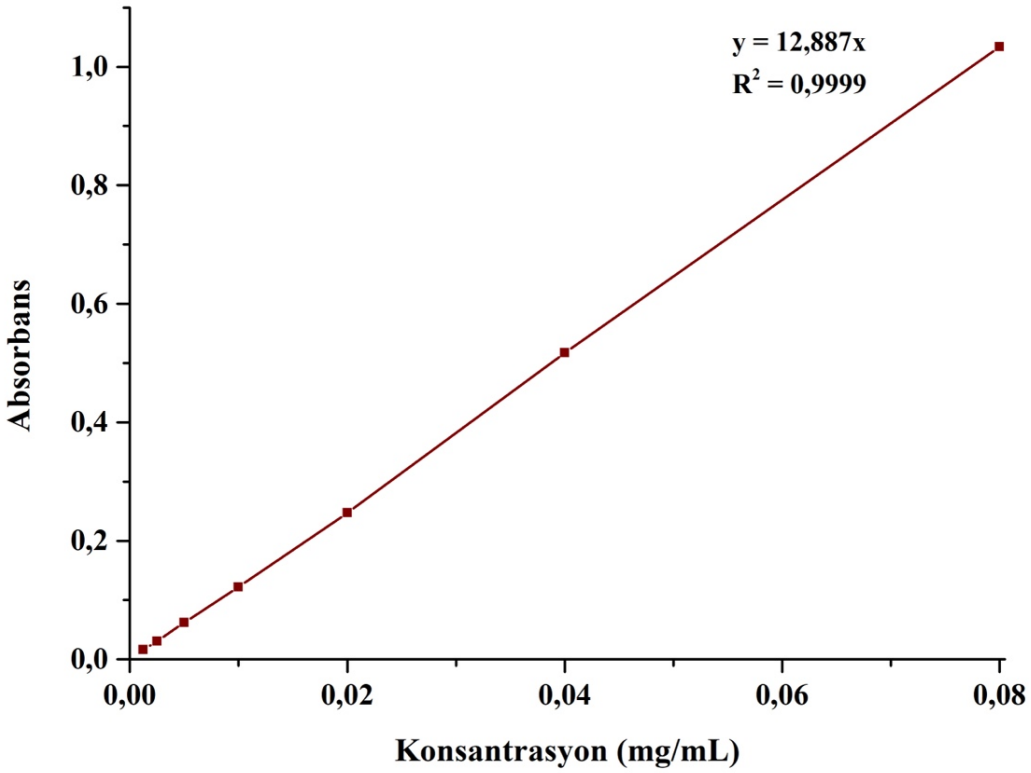
filtre kağıdı yerleştirilmiş petrilere dizilmiştir. Tohumların üzerleri filtre kağıdı ile örtülerek steril su ile filtreler nemlendirilmiş ve tohumlar 25 ± 1°C etüvde çimlenmeye bırakılmıştır. Deney, her petride 25 adet tohum olacak şekilde ve her konsantrasyon için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Tohumların çimlenme davranışları 14 gün boyunca belirli aralıklarla gözlemlenmiş ve çimlenen tohumlar sayılarak ortalama çimlenme oranı belirlenmiştir. Kökçük (radikul)'ün 2 mm'lik çıkışı çimlenmeye başlama kriteri (gün) olarak ele alınmıştır (Yaman ve diğ., 2021). Çimlenme yüzdesi 14.gün sonunda çimlenen tohumlar sayılarak denklem 3.5 kullanılarak belirlenmiştir (LI ve diğ., 2007).

$$\text{Çimlenme Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Çimlenen tohum sayısı}}{\text{Toplam tohum sayısı}} \times 100 \qquad (3.5)$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Juglon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Juglonun maksimum absorbans değerine sahip olduğu 424 nm'de, UV-spektrofotometre (VWR /UV-1600PC) kullanılarak; 0,08 mg/mL – 0,00125 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan juglon-etanol çözeltilerinin absorbans ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümler ile elde edilen kalibrasyon eğrisi ve denklemi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 : Juglona ait kalibrasyon eğrisi.

4.2 Kompleksin İnklüzyon Oranı, Yükleme Kapasitesi ve Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi

Çözücü buharlaştırma metodu kullanılarak elde edilen komplekslerin inklüzyon oranı, juglon yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimi Çizelge 4.1'de verilmiştir. İnklüzyon oranı %79,3, juglon yükleme kapasitesi %11,8 ve reaksiyon verimi %89,4 olarak bulunmuştur. İnklüzyon komplekslerinin üretiminde kullanılan alkol ve diklorometan gibi yardımcı çözücüler hem kullanılan aktif molekülün hem de siklodekstrinin çözünürlüğünde kullanılır. Siklodekstrinler %100 alkolde çözünmediğinden alkol-su oranının doğru bir şekilde ayarlanması önemlidir. Etanolün fazla kullanılması siklodekstrinlerin çözünürlüğünü azalttığından komplekslerin verimlerinde düşmeler olduğu gözlemlenmiştir (Al-Nasiri ve diğ., 2018).

Çizelge 4.1 : Kompleksin inklüzyon oranı, juglon yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimi.

İnklüzyon Oranı	Yükleme Kapasitesi	Reaksiyon Verimi
%79,3	%11,8	%89,4

Acar ve ark. (2023) yaptıkları çalışmada, çözücü buharlaştırma yöntemi kullanarak CAPE/β-siklodekstrin inklüzyon kompleksleri üretmişlerdir. CAPE molekülünü aynı molar oranda farklı etanol miktarlarında (5mL, 10mL, 15mL) çözdüklerinde, madde içeriği ve reaksiyon verimi daha yüksek molekülün %50 (v/v) EtOH/su içinde çözülmesiyle üretilen kompleksler olduğunu gözlemlemişlerdir (Acar ve diğ., 2023).

Yapılan bir çalışmada çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen kurkumin/β-siklodekstrin inklüzyon komplekslerinde %14 inklüzyon oranı görülmüştür (Mangolim ve diğ., 2014).

Astaksantin/β-CD ile yapılan başka bir çalışmada inklüzyon oranı %48,96 olarak bulunurken (Chen ve diğ., 2007), bir diğer çalışmada farklı konsantrasyonlarda çalışılan heptil metil keton (2-Nonanon)/β-CD komplekslerinin %34,8 ve %1,9 arasında değişen inklüzyon oranlarına sahip olduğu bulunmuştur (Abarca ve diğ., 2016).

4.3 J/β-CD/L Formülasyonunun Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Belirlenmesi

J/β-CD inklüzyon kompleksi yüklü lipozomların enkapsülasyon etkinliği santrifüj yöntemi ile belirlenmiştir. Santrifüj sonrası alınan üst fazdan yüklenmeyen juglon miktarının tayin edilmesiyle Eşitlik 3.4'te verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır. J/β-CD/L formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği %72,88 olarak bulunmuştur. Böylece juglonun iyi bir şekilde lipozomlara enkapsüle edildiği görülmüştür.

Lipozomlara ilaç yükleme miktarı sadece lipozom hazırlamada kullanılan yönteme değil, aynı zamanda ilaçların kimyasal özelliklerine, lipozomların bileşimine ve fizikokimyasal özelliklerine de bağlıdır (lipit konsantrasyonları ve yük özellikleri, ilaç/lipit oranları vb.). Moleküller lipozomlara aktif ve pasif olmak üzere iki farklı şekilde yüklenebilir. Lipozomlar hazırlandıktan sonra moleküllerin yüklendiği bizim de bu tez çalışmasında kullandığımız aktif yükleme yaklaşımı, pasif yükleme yönteme göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterir (Lombardo ve Kiselev, 2022).

4.4 Formülasyonların Boyut, Polidispersite İndeksi Ve Zeta Potansiyel Analizi

Lipozomların boyutu ve PDI değeri, lipozom karakterizasyonunda önemli bir yere sahiptir. Lipozom boyutunun inhalasyon ve parenteral uygulamalar için önemli bir faktör olduğu ve lipozomların dolaşımdaki yarı ömrünü belirlediği bilinmektedir (Elsana ve diğ., 2019). Daha küçük boyuttaki lipozomlar dolaşımda uzun süre kalabilirken, daha büyük lipozomlar kan dolaşımından hızlı bir şekilde elimine edilir (Sercombe ve diğ., 2015). İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanımları için, lipozomların arzu edilen boyutu genellikle 50 ila 200 nm arasında değişmektedir (Guimarães ve diğ., 2021). Şekil 4.2 formülasyonun boyut ve dağılımını gösteren bir histogram grafiğidir. Elde edilen lipozomal formülasyonun boyutu 106,1± 0,5 nm olarak ölçülmüştür. Bu değer de formülasyonun kullanıma uygun bir boyut aralığında olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.3'te lipozomal J/β-CD ile J/β-CD inklüzyon kompleksinin boyut karşılaştırması verilmiştir. İnklüzyon kompleksinin lipozom ile formüle edildiğinde daha istenen boyutlara sahip olduğu görülmektedir.

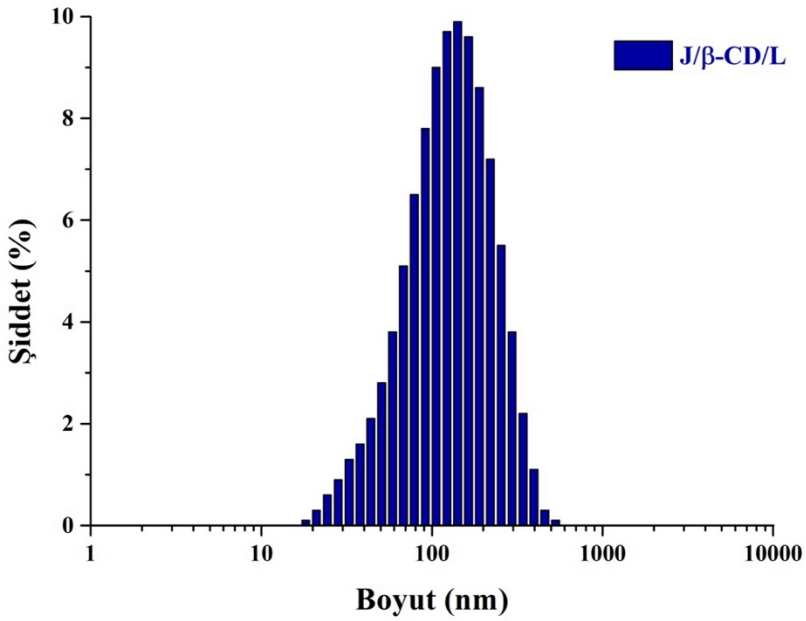
PDI değeri, 0 ile 1 arasında değişen değerlerle boyut dağılımını ifade eder. Bu monodispers veya polidispers olabilen örnek heterojenliğinin derecesini ortaya koyar. PDI değeri boyutsuzdur. Lipozomlar kullanılarak yapılan ilaç taşıyıcı sistemlerde, 0,3'e eşit veya altındaki bir PDI homojen dağılımı ifade eder (Danaei ve diğ., 2018).

Hazırlanan lipozomal formülasyonun PDI değeri 0,247 ± 0,012 olarak ölçülmüştür. Bu değer 0,3'den küçük bir değer olduğundan elde edilen ürünün monodispers bir dağılım aralığına yakın olduğu söylenebilir.

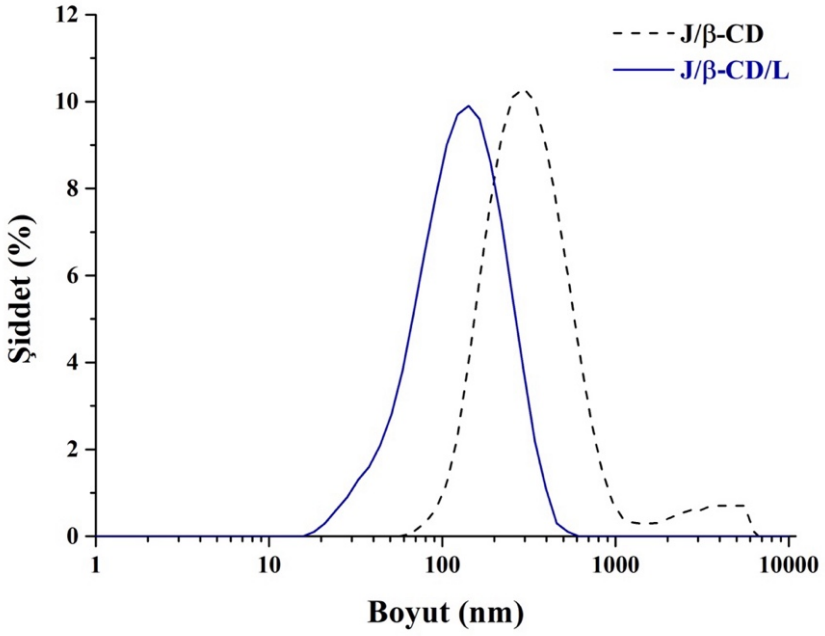
J/β-CD/L son formülasyonun boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 : J/β-CD/L formülasyonun boyut, PDI ve Zeta potansiyel değerleri.

Boyut (nm)	Polidispersite Indeksi	Zeta Potansiyel (mV)
106,1 ± 0,5	0,247 ± 0,012	-49,2 ± 1,36



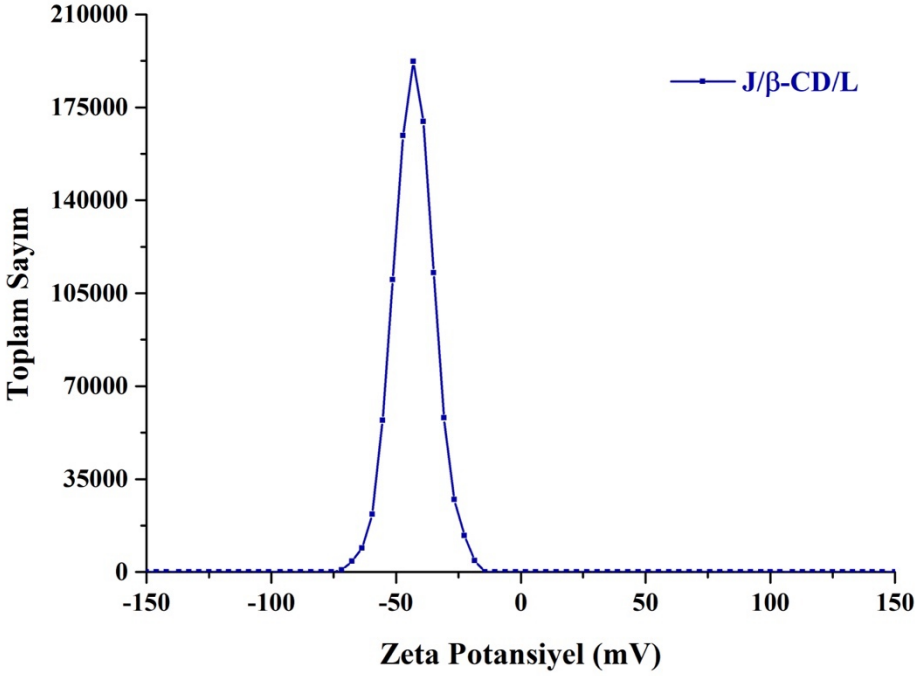
Şekil 4.2 : J/β-CD/L formülasyonunun boyut dağılım grafiği.



Şekil 4.3 : J/β-CD ve J/β-CD/L formülasyonlarının karşılaştırmalı boyut dağılım grafiği.

Partiküllerin genel net yükü genellikle yüzey veya zeta potansiyeli olarak ifade edilir (Kraft ve diğ., 2014). Zeta potansiyeli, süspansiyondaki partiküller arasındaki elektrostatik etkileşimleri belirlediğinden oldukça önemli bir fiziksel özelliktir. Lipozomların net yükü, lipit bileşimi, lipitlerin baş grubu ve ilişkili ligandlar farklı parametrelerden etkilenir. Zeta potansiyeli dış ortamdan ve iyonik gücünden de etkilenebilir (Kaszuba ve diğ., 2010). Zeta potansiyel ölçümleri, lipozomlar gibi kolloidal sistemlerin bulundukları ortamdaki kararlılığını tahmin etmek için kullanılır. Genellikle, düşük zeta potansiyeline sahip veya yüksüz lipozomların zamanla agrege olma olasılığı daha yüksektir, çünkü lipozomların topaklanmasını engelleyecek bir kuvvet olmayacaktır. Aksi takdirde, büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyel yüküne sahip süspansiyondaki lipozomlar, ortamda doğal agregasyon eğilimini önleyen itici kuvvetler sunar (Guimarães ve diğ., 2021). Hazıralanan formülasyonun zeta potansiyeli -49,2 ± 1,36 mV'tur (Şekil 4.4). Bu yüksek zeta potansiyel değeri

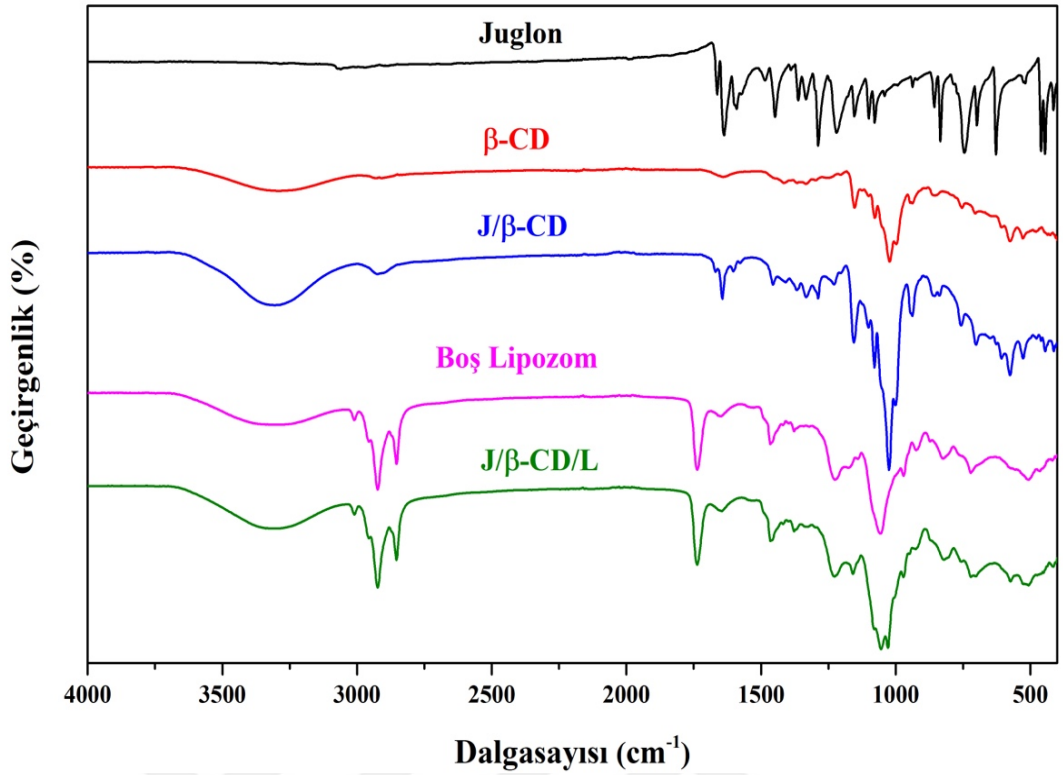
lipozomun bulunduğu çözeltide agrege olmadan stabil bir şekilde kalabildiğini göstermetedir.



Şekil 4.4 : J/β-CD/L formülasyonun zeta potansiyel grafiği.

4.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Kızılötesi (IR) spektroskopisi, yapısal analiz için kullanılan spektroskopik bir tekniktir ve IR radyasyonunun madde ile etkileşimine dayalı olarak atomların bağ yapısını karakterize etmek için kullanılan bir yöntemdir (Ţucureanu ve diğ., 2016).



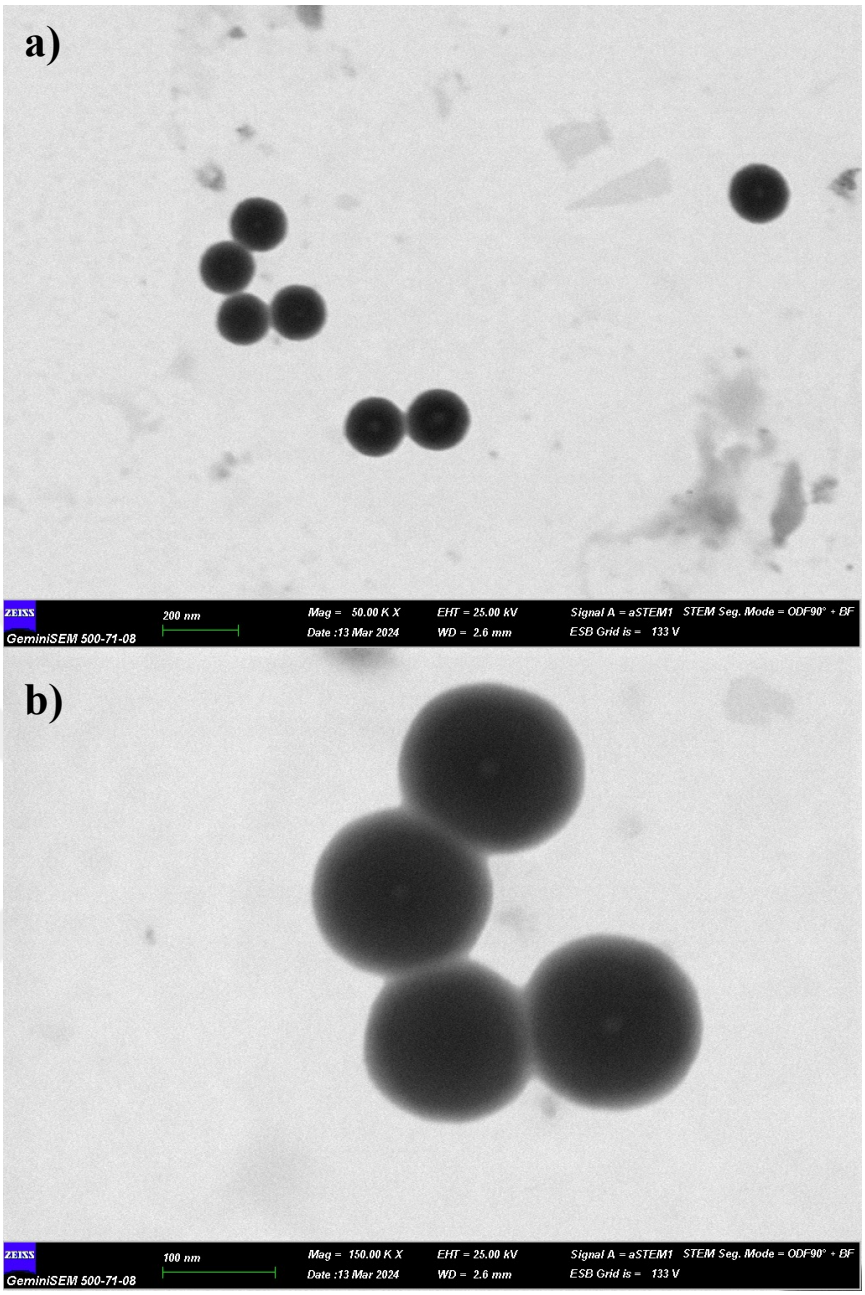
Şekil 4.5 : Malzemelerin FTIR spektrumu.

Juglon, β-CD, J/β-CD inklüzyon kompleksi, boş lipozom ve lipozomal J/β-CD formülasyonun FTIR spektrumları Şekil 4.5'te verilmiştir.

Juglon 1637 cm^{-1} noktasında karbonil gruplarına ait (C=O), 1591 cm^{-1}'de C=C gerilmesi 1288 cm^{-1}' de C=O gerilmesi gibi karakteristik pikler vermiştir (Arasoglu ve diğ., 2016b). İnklüzyon kompleksi ve serbest juglon karşılaştırıldığında, juglon piklerinin azalmış olması juglonun çoğunlukla konak boşluğuna lokalize olduğunu göstermektedir. Bu da verimli bir inklüzyon kompleksi sentezinin göstergesi olabilir. Boş lipozom ve J/β-CD/L formülasyonunun FTIR pikleri kıyaslandığında, pik görüntülerinin birbirlerine çok benzer olması, inklüzyon kompleksinin lipozomun hidrofilik boşluğuna yerleşerek başarılı bir enkapsülasyonun sağlandığını göstermektedir.

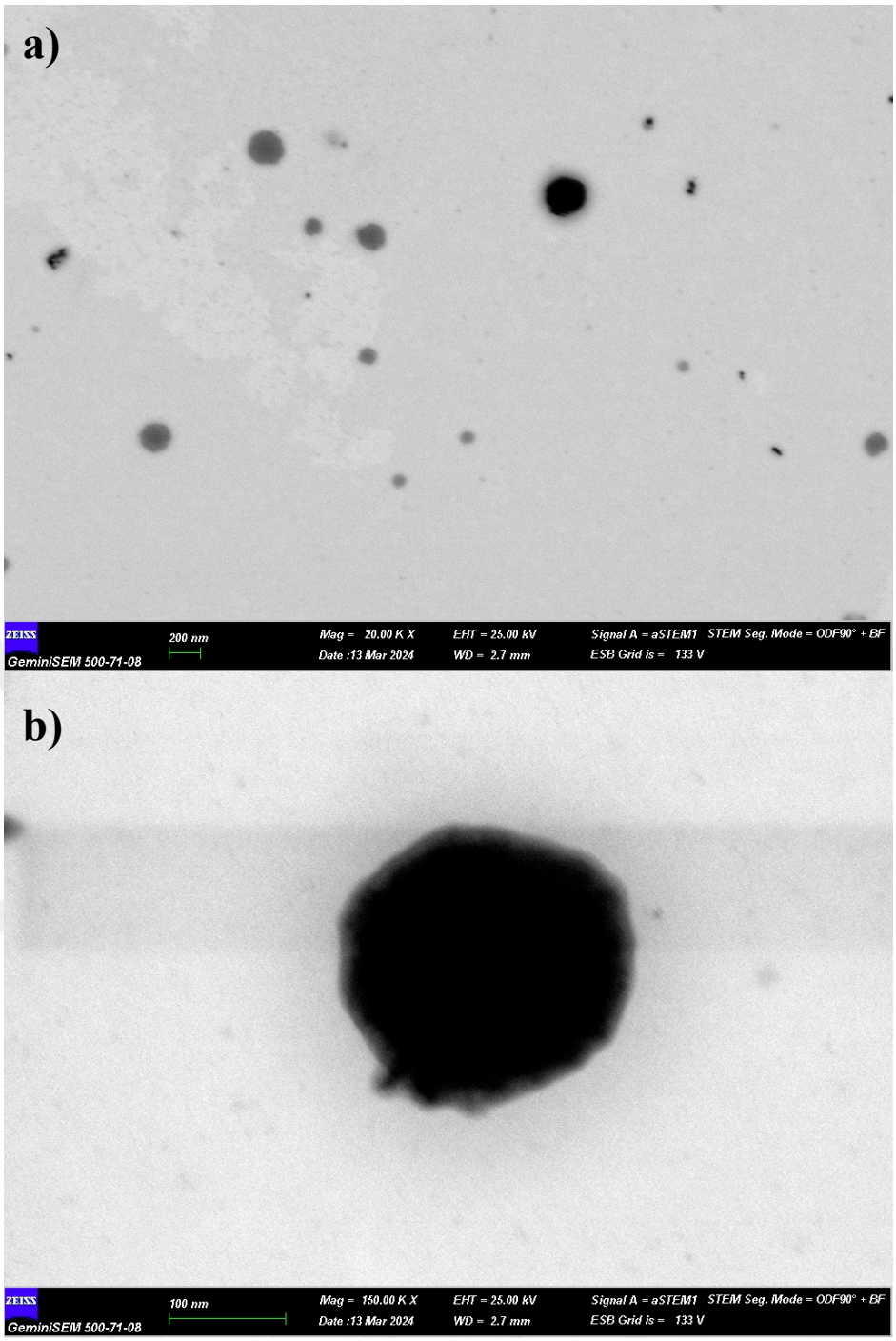
4.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

STEM görüntüleri formülasyonların boyut ve morfolojilerinin gözlemlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir (Abbas ve diğ., 2022). Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi J/β-CD inklüzyon kompleksleri yuvarlak ve düz bir yüzey morfolojisine sahiptir.



Şekil 4.6 : J/β-CD inklüzyon kompleksinin a) 50 000 büyütmeli (ölçek: 200 nm) b) 150 000 büyütmeli (ölçek: 100 nm) STEM mikrografları.

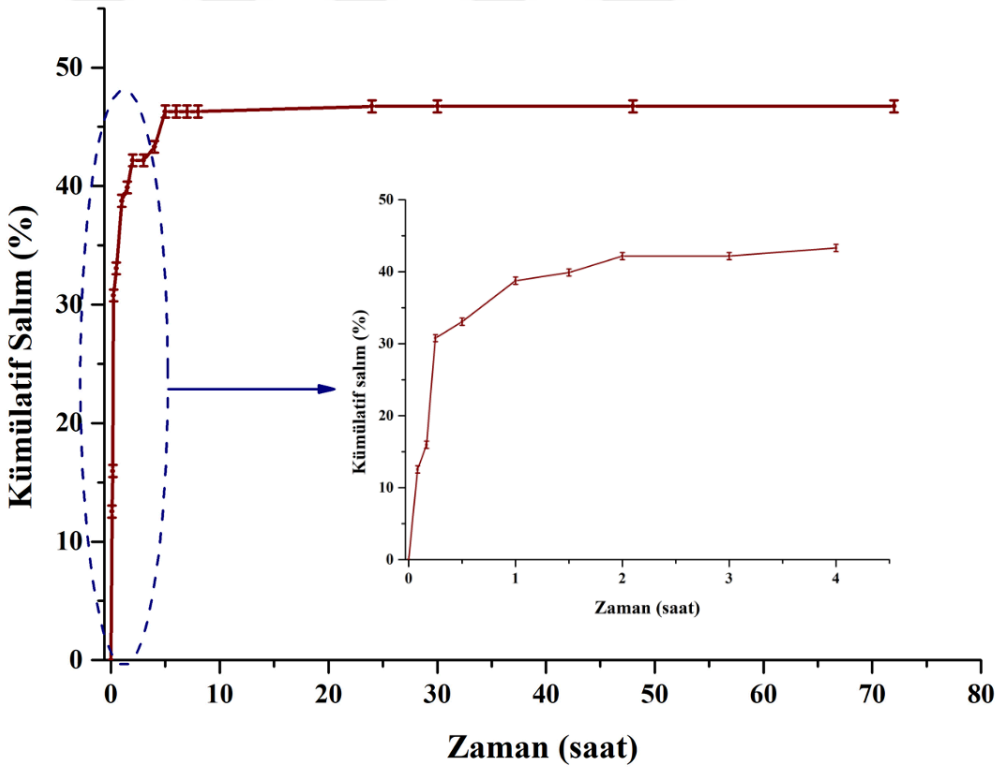
Lipozomal J/β-CD formülasyonunun STEM görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Buna göre elde edilen son formülasyon nispeten düzgün bir şekle ve düz bir yüzey morfolofisine sahiptir. Aynı zamanda STEM görüntüleri, vezikül oluşumundan sonra membran çift tabakasının sağlam olduğunu göstermiştir. Bu da J/β-CD kompleksinin fosfolipid vezikül içerisine dahil edilmesinin lipid tabakasının bütünlüğünü etkilemediğini göstermiştir.



Şekil 4.7 : Lipozomal J/β-CD formülasyonunun a) 20 000 büyütmeli (ölçek: 200 nm) b) 150 000 büyütmeli (ölçek: 100 nm) STEM mikrografları.

4.7 *In vitro* Juglon Salımı

Juglonun J/β-CD/L formülasyonundan salımı, 37 ± 1°C'de pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz yöntemi ile *in vitro* incelenmiştir. Lipozomların salım profili 72 saat boyunca incelenmiş ve sonuçlar zamanın bir fonksiyonu olarak % kümülatif salınan juglon miktarını gösterecek şekilde Şekil 4.8'de verilmiştir. Başlangıçta ilk 1 saat boyunca ani ve hızlı bir salım gözlenmiş, sonraki saatlerde bunu sürekli ve yavaş bir salım izlemiştir. J/β-CD yüklü lipozomlardan juglon salımı ilk üç satte %39,89'a ve 72 satte %46,73'e ulaşmıştır. Formülasyondaki juglon, lipozomların sahip olduğu rezervuar etkisi nedeniyle zamanla kontrollü bir oranda salınmıştır (Jhan ve Pethe, 2020). Önce ani bir salımın (burst release) gerçekleştiği, daha sonra da kontrollü bir şekilde devam eden bu salım profili "bifazik salım" olarak bilinmekte ve literatürdeki diğer lipozomdan salım çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (Lira ve diğ., 2009; Shaji ve Iyer, 2012).



Şekil 4.8 : Lipozomal J/β-CD formülasyonundan juglonun *in vitro* salım profili.

Aktif madellerin farmakokinetiğinde ve terapötik etkinliğinde bir iyileşme arayışında, lipozomlara kapsüllenmiş siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin potansiyel kullanımı bir çok çalışmada rapor edilmiştir (Cavalcanti ve diğ., 2011; Hagiwara ve diğ., 2006; Shaji ve Iyer, 2012).

Literatürdeki çalışmalarda lipozomlara dahil edilen ilaç/β-siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin, sadece ilaç yüklü lipozomlara göre daha yavaş bir salım kinetiğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar bu davranışı, ilacın lipozomlarda siklodekstrin ile kompleksleşmesinden ve/veya lipozomal membranın siklodekstrin tarafından stabilize edilmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlamaktadır (Hagiwara ve diğ., 2006). Yapılan bu çalışmada da J/β-CD inklüzyon kompleksi içeren lipozomların stabil olduğu ve konrollü bir salım sistemi özelliği taşıdığı görülmektedir.

4.8 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

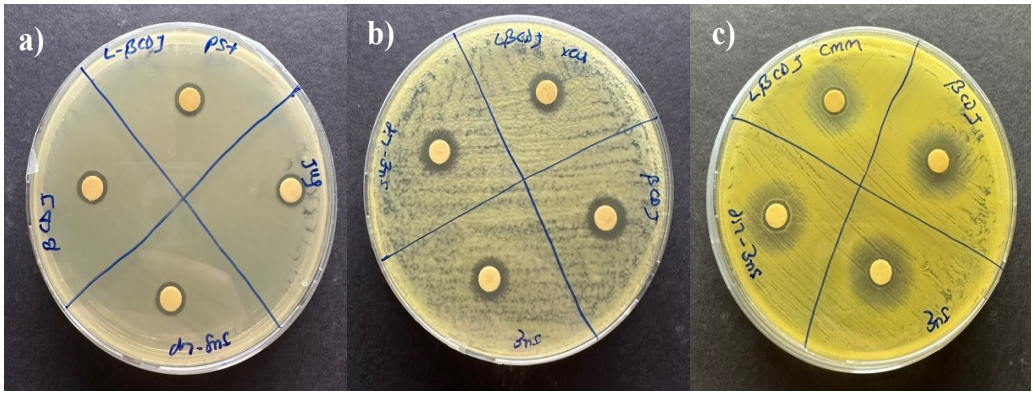
4.8.1 Agar disk difüzyon testi

Formülasyonların agar disk difüzyon testi sonucunda oluşturdukları inhibisyon zonları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Formülasyonların tamamının 3 bakteri suşu için de serbest juglona kıyasla daha yüksek inhibisyon zonuna sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3 : Formülasyonların inhibisyon zonları (mm).

Mikroorganizmalar	Formülasyonlar			
	Juglon	J/β-CD	J/β-CD/L	J/L
Pst (SH-1)	8	8,8	9	8,2
Xeu (SH-2)	9,3	10,3	10,6	10,3
Cmm (SH-3)	7	8	8	8

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi üretilen formülasyon test edilen bakteri suşları üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Pst bakteri suşu için en yüksek inhibisyon sonu 9 mm ile J/β-CD/L formülasyonunda, Xeu bakteri suşu için 10,6 mm ile J/β-CD/L formülasyonunda görülmüştür. Örneklerin Cmm bakterisi üzerindeki etkileri incelendiğinde inhibisyon zonlarının J/β-CD, J/β-CD/L ve J/L için aynı olduğu anlaşılmıştır. Cmm bakterisi, üzerindeki net zonlar 8 mm civarında olmasına rağmen, formülasyonlar yaklaşık 17 mm çapa sahip bir alanda bakteri yoğunluğunu azaltmıştır.



Şekil 4.9 : Serbest juglon, J/β-CD, J/β-CD/L ve J/L'nin (A) Pst, (B) Xeu ve (C) Cmm suşları üzerindeki inhibisyon zonları.

DMSO, toksikoloji ve farmakoloji çalışmalarında, hücrelerin kriyoprezervasyonunda ve topolojik tedaviler sırasında permeabilizasyon arttırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DMSO'nun membran geçirgenliğini değiştirdiği bilinmektedir. DMSO'nun genellikle %10'un (h/h) altında toksik olmadığı kabul edilir ve etkilerinin ihmal edilebilir olduğu varsayılır. Bununla birlikte, düşük DMSO seviyelerinde *in vivo* toksisite bildiren çalışmalar nedeniyle son yıllarda yaygın kullanımı biraz tartışmalı olmuştur (Galvao ve diğ., 2014; Verheijen ve diğ., 2019). Bu sonuçlar, biyolojik deneylerde *in vivo* uygulama için bir çözücü olarak düşük konsantrasyonlarda DMSO kullanıldığında bile güvenlik endişeleri olduğunu göstermektedir. Amaral ve ark. (2024) yaptıkları çalışmada; DMSO'nun lipozomlar içindeki lipit-lipit ve ilaç-lipit etkileşimlerini değiştirebileceğini, ilacın birleşmesini, tutulmasını ve genel termodinamik parametreleri etkileyebileceğini, DMSO'nun lipid çift katmanlı paketleme yoğunluğu ve lipid-lipid etkileşimlerinin bozulması üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir (Amaral ve diğ., 2024).

Sadece antibakteriyel aktivite çalışmalarına dahil ettiğimiz juglon/lipozom (J/L) formülasyonunun elde edilmesi için, hidrofobik molekül juglonun organik bir çözücüde çözülmesi gerekmektedir. Juglon, DMSO içerisinde çözdürülmek istendiğinde yalnızca yüksek DMSO konsantrasyonlarında iyi çözünmektedir. Bu da önceden hazırlanmış lipozomlar ile yükleme için karıştırdıklarında, son molekülde yüksek DMSO konsantrasyonlarının bulunmasına sebebiyet vermektedir. Her ne kadar bu molekülün de antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlense de DMSO'nun canlı üzerindeki olumsuz etkileri iyi bilindiğinden bu molekülün kullanımı tarım uygulamaları için doğru bir yaklaşım olmayacaktır (X. H. Zhang ve diğ., 2016).

4.8.2 Minimum inhibisyon konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon testi

Elde edilen formülasyonların minimum hangi konsantrasyonda antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunun bulunması için MİK ve MBK testleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre Çizelge 4.4'te verilen MİK değerleri incelendiğinde SH-1 (Pst) bakterisi için serbest juglon, J/β-CD ve J/L formülasyonlarının MİK değeri 147,5 µg/mL olarak bulunmuştur. SH-2 (Xeu) bakteri suşu için MİK değeri J/β-CD için 73,75 µg/mL olarak serbest juglon ve J/L için 147,5 µg/mL olarak bulunmuştur. SH-3 (Cmm) suşu için ise serbest juglonun ve J/L'nin formülasyonlardan daha yüksek konsantrasyonda etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.4 : Formülasyonların MİK değerleri.

Mikroorganizmalar	MİK (µg/mL) Örneğe göre			
	Juglon	J/β-CD	J/β-CD/L	J/L
Pst (SH-1)	147,5	147,5	68,93	147,5
Xeu (SH-2)	147,5	73,75	34,47	147,5
Cmm (SH-3)	295	73,75	68,93	295

Hazırlanan lipozomal juglon/β-CD (J/β-CD/L) formülasyonunun MİK değerleri hesaplanırken juglonun bu formülasyondan 48 saatlik inkübasyon süresi içindeki kümülatif salım miktarı dikkate alınmıştır. Lipozomlar ve β-CD molekülleri tek başına antibakteriyel aktiviteye sahip olmadıklarından, antibakteriyel madde olan juglonun formülasyondan salındığı ve bakteri ile temas ettiği miktar önemlidir. J/β-CD/L'nin MİK değerleri SH-1 (Pst) ve SH-3 (Cmm) bakterisi için 68,93 µg/mL, SH-2 (Xeu) bakterisi için 34,47 µg/mL'dir. Veriler gözden geçirildiğinde, J/β-CD inklüzyon kompleksinin lipozomal enkapsülasyonunun, 3 bakteri suşu üzerinde de juglonun antibakteriyel özelliğini arttırdığı gözlemlenmektedir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, lipozomal formülasyonların bakteriyel dış membranlarla etkileştikleri ve nihayetinde membranlarla füzyon yoluyla içeriklerini bakteriyel hücrelere ilettikleri görülmüştür. Bu etkileşimin ürünlerin hücre içine sızmasını ve hücre ölümünü kolaylaştırdığı bilinmektedir. Dolayısıyla daha düşük

malzeme konsantrasyonlarında daha yüksek antibakteriyel etkiler görülmektedir (Olatunde ve diğ., 2019). Yapılan bir çalışmada lipozomal enkapsülasyonun, aminoglikozitlerin bakteri hücrelerine nüfuzunu arttırarak antibiyotiğe dirençli *Burkholderia cenocepacia* suşlarını inhibe etmek için, serbest haline kıyasla daha düşük konsantrasyon sağladığı bulunmuştur (Halwani ve diğ., 2007).

Başka bir çalışmada, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* dahil olmak üzere, yaygın dirençli bakterilerin çoğuna karşı, lipozomal siprofloksasin ve gentamisinin antibakteriyel aktivitesinin serbest juglona göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Lipozomların bakteri hücresinin dış membranı ile etkili ve kapsamlı temasının, formülasyonların gelişmiş antibakteriyel etkinliğinin nedeni olduğunu öne sürmüşlerdir (Olatunde ve diğ., 2019).

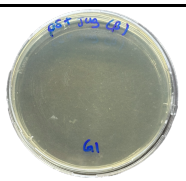
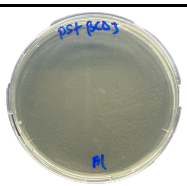
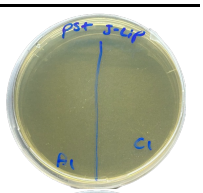
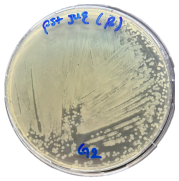
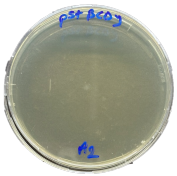
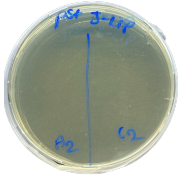
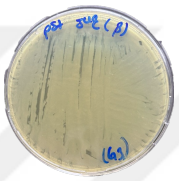
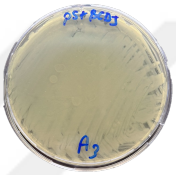
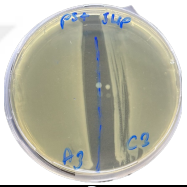
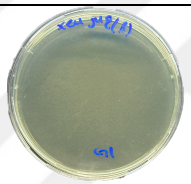
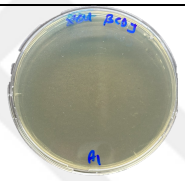
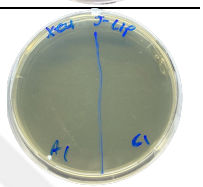
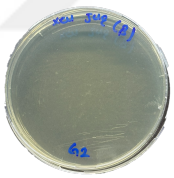
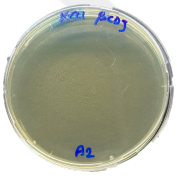
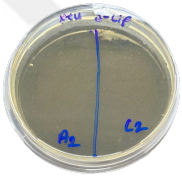
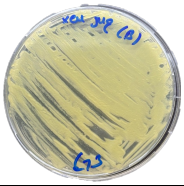
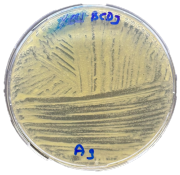
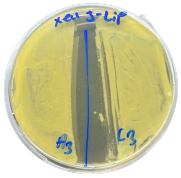
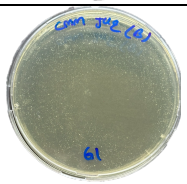
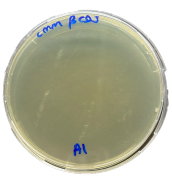
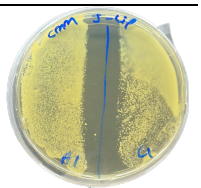
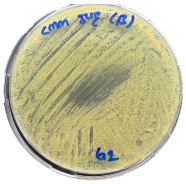
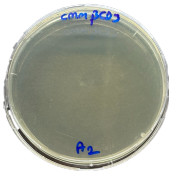
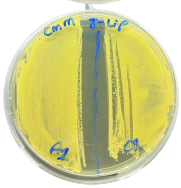
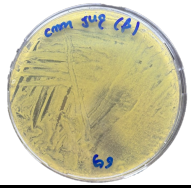
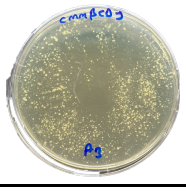
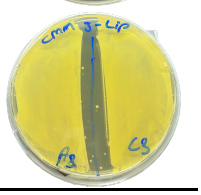
MBK değerleri için Çizelge 4.5 incelendiğinde bütün bakteri suşları için, elde edilen J/β-CD/L formülasyonunun serbest juglona göre daha iyi bakterisidal özellik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5 : Formülasyonların MBK değerleri.

Mikroorganizmalar	MBK (µg/mL) Örneğe göre			
	Juglon	J/β-CD	J/β-CD/L	J/L
Pst (SH-1)	295	147,5	68,93	147,5
Xeu (SH-2)	295	147,5	68,93	295
Cmm (SH-3)	>295	147,5	137,87	>295

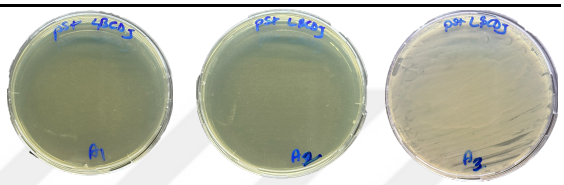
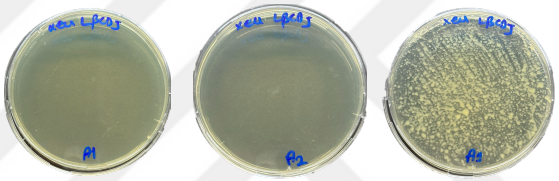
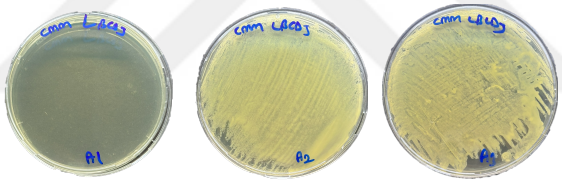
Çizelge 4.6'da juglon, J/β-CD ve J/L örneklerinin, minimum bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılan ekimler soncunda elde edilen petri görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.6 : Juglon, J/β-CD ve J/L örneklerinin MBK için ekilen petri görüntüleri.

Bakteri Suşları	Konsantrasyonlar (µg/mL)	Örnekler		
		Juglon	J/β-CD	J/L
Pst (SH-1)	295			
	147,5			
	73,75			
Xeu (SH-2)	295			
	147,5			
	73,75			
Cmm (SH-3)	295			
	147,5			
	73,75			

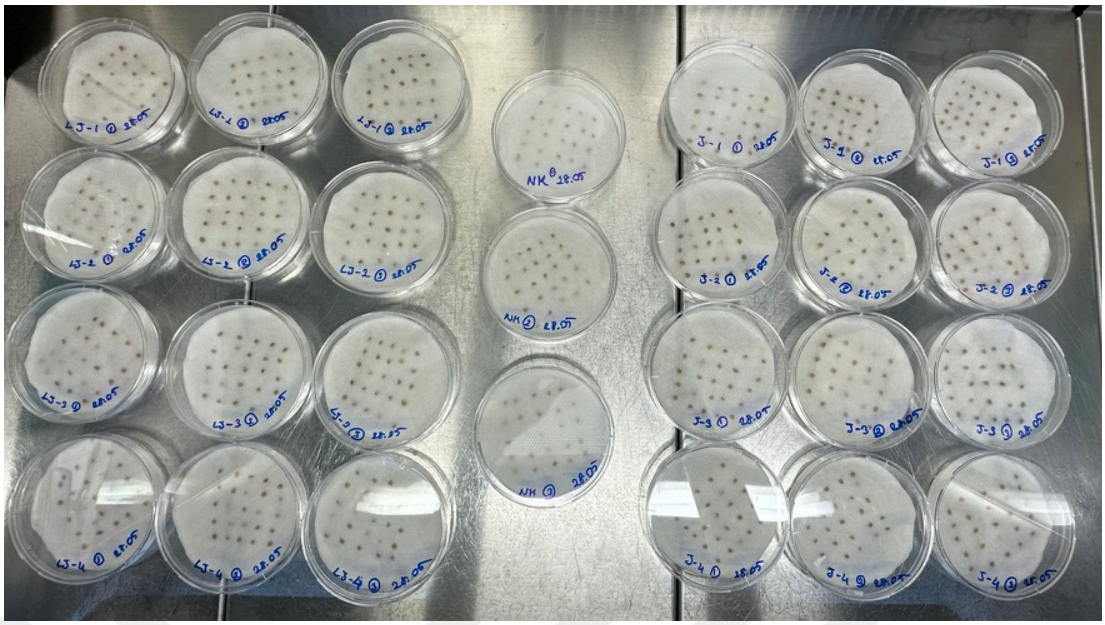
Çizelge 4.7'de ise J/β-CD/L formülasyonunun minimum bakterisidal konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan ekimler soncunda elde edilen petri görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.7 : J/β-CD/L formülasyonunun MBK belirlenmesi için yapılan ekim sonucu petri görüntüleri.

Bakteri Suşları	Konsantrasyonlar (µg/mL)		
	137,87	68,93	34,47
Pst (SH-1)			
Xeu (SH-2)			
Cmm (SH-3)			

4.9 Tohum Çimlenme Testi

Tohum deneyleri H-2274 cinsi ticari domates tohumları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kurulan deney setleri her formülasyon için 3 tekrarlı ve her bir petride 25 adet tohum olacak şekilde (25x3=75 tohum) hazırlanmıştır. Formülasyonlar; NK (negatif kontrol, üzerine herhangi bir örnek uygulaması yapılmamış tohumlar), serbest juglon uygulanan tohumlar (Juglon 1-4) ve J/β-CD/L uygulanan tohumlar (J/β-CD/L 1-4) olarak MİK konsantrasyonlarının bir alt ve bir üst değeri olarak farklı konsantrasyonlarda düzenlenmiştir (Şekil 4.10). Konsantrasyonlar; uygulanan formülasyon konsanstrasyonuna göre, toplam juglon miktarı baz alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10 : Domates tohumları ekilmiş petriler (1.Gün).

- Juglon 1 = 295 µg/ml serbest juglon,
- Juglon 2 = 147,5 µg/ml serbest juglon,
- Juglon 3 = 73,75 µg/ml serbest juglon,
- Juglon 4 = 36,875 µg/ml serbest juglon,
- J/β-CD/L 1 = 2,5 mg/mL J/β-CD/L = 295 µg/ml serbest juglon,
- J/β-CD/L 2 = 1,25 mg/mL J/β-CD/L = 147,5 µg/ml serbest juglon,
- J/β-CD/L 3 = 0,625 mg/mL J/β-CD/L =73,75 µg/ml serbest juglon,
- J/β-CD/L 4 = 0,3125 mg/mL J/β-CD/L = 36,875 µg/ml serbest juglon içerir.

Çizelge 4.8'de 14 gün boyunca belirli aralıklarla takip edilen tohumların çimlenme sayıları verilmiştir. Tablodaki değerler yapılan üç tekrardaki çimlenen tohumların ortalamalarının alınması ile oluşturulmuştur.

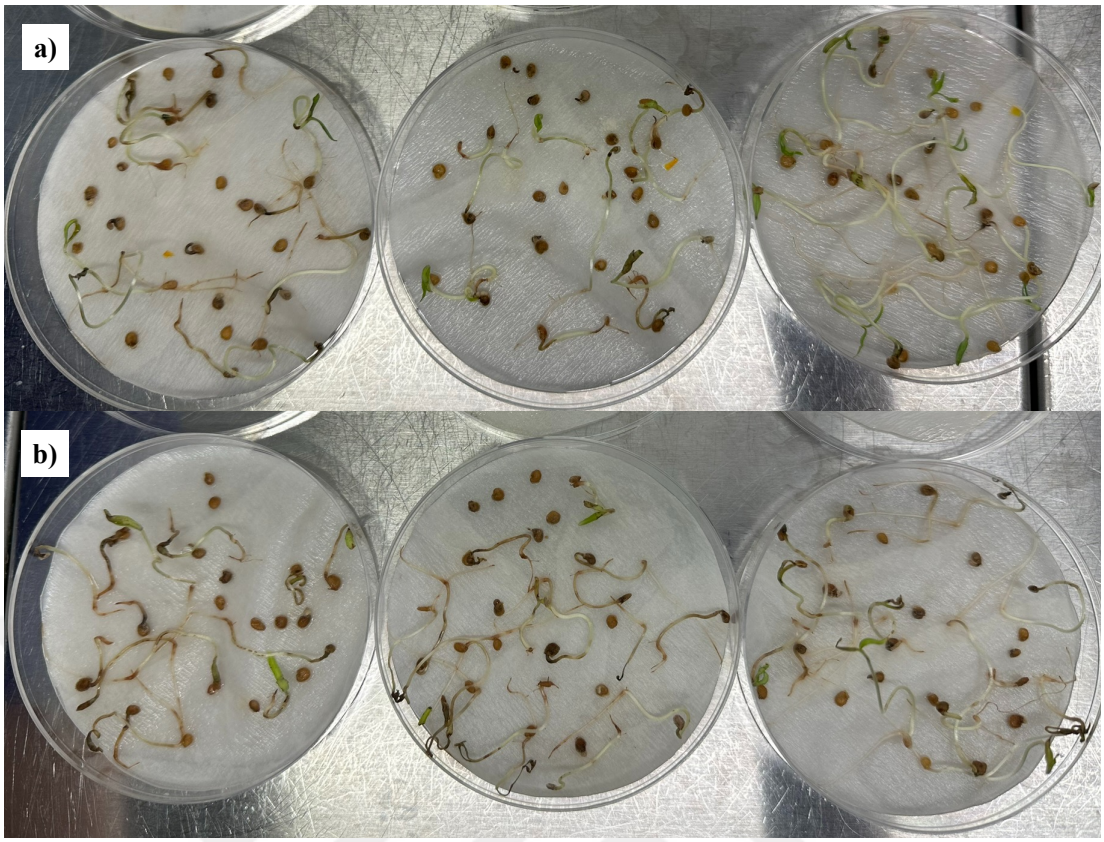
Veriler incelendiğinde 7. günün sonunda en çok çimlenen setin 295 µg/ml serbest juglon içeren juglon 1 formülasyonu ve 295 µg/ml serbest juglon içeren; 2,5 mg/mL J/β-CD/L formülasyonu ile muamele edilmiş tohumlar olduğu görülmüştür.

14. günün sonunda en çok çimlenen setin ise 73,75 µg/ml serbest juglon içeren; 0,625 mg/mL J/β-CD/L formülasyonu ile muamele edilmiş tohumlar olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.8 : Günlere göre çimlenen tohum sayısı

Formülasyonlar	Günlere göre çimlenen tohum sayısı				
	3.Gün	5.Gün	7.Gün	9.Gün	14.Gün
NK	12	15	16,67	18	18,67
Juglon 1	13	17,33	19,67	21,33	21,33
Juglon 2	15,67	17,67	19,33	20,33	21
Juglon 3	16	17,67	18,33	19,67	19,67
Juglon 4	14,67	17,33	19	19,67	20
J/β-CD/L 1	13,33	17,67	19,67	21	21,33
J/β-CD/L 2	14,67	16	17,67	20	20,33
J/β-CD/L 3	16,33	17	19	20,67	21,67
J/β-CD/L 4	14,67	16,67	19	19,67	20,33

.



Şekil 4.11 : Çimlenen tohumlar (14.gün); a) negatif kontrol b) J/β-CD/L 3.

Şekil 4.11'de 14. günün sonunda negatif kontrolün ve en çok çimlenen setin (73,75 µg/ml serbest juglon içeren; 0,625 mg/mL J/β-CD/L formülasyonu) görselleri verilmiştir.

Çizelge 4.9'da ise formülasyon uygulanmış ve uygulanmamış tohumlar arasından kaç tanesinin 14. gün sonunda çimlenip çimlenmediği, çürük tohum sayısı ve çimlenme yüzdesi verilmiştir. Veriler 3 tekrarın ortalaması şeklinde tabloda görülmektedir. Çimlenmemiş tohum sayısı ve çürük tohum sayısı en fazla negatif kontrolde görülmüştür. Buradan da uygulanan formülasyonların tohumlar üzerinde oldukça olumlu etkiye sahip oluğu ve çimlenmelerini geciktirmedikleri yorumu çıkarılabilir. Çimlenme yüzdesi en çok J/β-CD/L 3'te görülürken onu J/β-CD/L 1 ve juglon 1 formülasyonları takip etmiştir. Çimlenme yüzdesi en düşük negatif kontrollerin olduğu petride görülmüştür.

Çizelge 4.9 : Çimlenmemiş tohum sayısı, çürük tohum sayısı ve çimlenme yüzdesi

Formülasyonlar	Çimlenmemiş tohum sayısı	Çürük tohum sayısı	Çimlenme Yüzdesi (%)
NK	6,33	7	74,67
Juglon 1	3,67	2,33	85,33
Juglon 2	4	1,67	84
Juglon 3	5,33	2	78,67
Juglon 4	5	3,33	80
J/β-CD/L 1	3,67	2,67	85,33
J/β-CD/L 2	4,67	4,67	81,33
J/β-CD/L 3	3,33	3,67	86,67
J/β-CD/L 4	4,67	3,33	81,33

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, juglon molekülünün hidrofilikliğini arttımak adına hazırlanan juglon/β-CD inklüzyon kompleksleri, literatürde ilk kez lipozomal formülasyon haline getirilmiştir. Bunun için öncelikle inklüzyon kompleksleri çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlanmış, daha sonra sonikasyon metodu ile hazırlanan boş lipozomların içerisinde çözdürülerek enkapsülasyon sağlanmıştır.

Hazırlanan inklüzyon komplekslerinin inklüzyon oranı %79,3, yükleme kapasitesi %11,8 ve reaksiyon verimi %89,4 olarak, UV spektrofotometrede 424 nm'de alınan ölçümlerin standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak denklemlere göre hesaplanması ile bulunmuştur. J/β-CD/L formülasyonunun juglon enkapsülasyon etkinliği santrfüj yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan boş lipozomlara inklüzyon kompleksinin sonradan dahil ediliği, aktif taşıma yöntemi kullanılan J/β-CD/L formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği %72,88'dir. Bu da juglonun iyi bir şekilde sisteme enkapsüle edilebildiği anlamına gelir.

Hazırlanan lipozomal formülasyonun boyutu 106,1 ± 0,5 nm, PDI değeri 0,247 ± 0,012 ve zeta potansiyeli -49,2 ± 1,36 mV olarak ölçülmüştür. Bu değerler hücresel alıma uygun boyutlarda, monodispers dağılıma sahip ve kolloidal stabilitesi yüksek bir nano formülasyonun hazırlandığını ifade etmektedir.

Elde edilen FTIR sonuçlarına göre, juglona ait karakteristik piklerin, inklüzyon kompleksi haline geldiğinde bir kısmının kaybolması, juglonun çoğunlukla β-CD kavitesinde olduğunu göstermektedir. Boş lipozom ve J/β-CD inklüzyon kompleksi içeren lipozomlar karşıltığında iki FTIR grafiğinin de birbirine oldukça benzemesi lipozomal enkapsülasyonun da başarılı bir şekilde sağlandığını göstermektedir. STEM sonuçları; J/β-CD inklüzyon kompleksleri ve J/β-CD/L formülasyonu için de yüzeyleri düz, düzgün bir boyut dağılımda (monodispers), yuvarlak partiküllerin oluşturulduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca lipozomal enkapsülasyonun, membran çift tabakasının bütünlüğünü etkilemediği, enkapsülasyonun düzgün bir şekilde gerçekleştiği de görülmektedir.

J/β-CD/L formülasyonunundan juglon salımı 37 ± 1°C' de pH 7,4 fosfat tamponunda diyaliz yöntemi ile *in vitro* gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta ilk 1 saat boyunca ani ve hızlı bir salım gözlenmiş, sonraki saatlerde bunu sürekli ve yavaş bir salım izlemiştir. Önce ani bir salımın (burst release) gerçekleştiği, daha sonra da kontrollü bir şekilde devam eden bu salım profili "bifazik salım" olarak bilinmektedir. J/β-CD yüklü lipozomlardan juglon salımı ilk üç satte %39,89'a, 72 satte % 46,73'e ulaşmıştır. Görüldüğü gibi juglon molekülü lipozomun içinden kontrollü bir şekilde salınır. Bu tür kontrollü salım sistemleri içlerine yüklenen aktif maddelerin tekrar dozlarından ve olası yan etkilerinden kaçınmayı sağlayarak, canlıya uygulama için onları daha verimli bir hale getirir.

SH-1, SH-2 ve SH-3 (Pst, Xeu, Cmm) olmak üzere 3 bakteri suşu üzerinde yapılan antibakteriyel aktivite sonuçlarına göre elde edilen son lipozomal formülasyonun serbest juglona göre antibakteriyel aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Agar disk difüzyon testine göre J/β-CD/L formülasyonu SH-1 üzerine 9 mm, SH-2 üzerine 10,6 mm ve SH-3 üzerine 8 mm inhibisyon zonu göstermiştir.

Antibakteriyel özelliğe sahip aktif molekül juglonun J/β-CD/L formülasyonundan bakteriyel inkübasyon süreci boyunca (48 saat) kümülatif salım miktari %46,73' tür. Dolayısıyla formülasyonun MİK ve MBK değerleri hesaplanırken bu farklılık göz önünde bulundurulmuştur. J/β-CD/L formülasyonunun SH-1, SH-2 ve SH-3 üzerindeki MİK değerleri sırasıyla 68,93 µg/mL, 34,47 µg/mL ve 68,93 µg/mL olarak, MBK değerleri ise 68,93 µg/mL, 68,93 µg/mL ve 137,87 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Değerler incelendiğinde bu formülasyonun her bakteri suşu için antibakteriyel özelliği arrtırdığı görülmektedir. Lipozomal formülasyonlar bakteri dış membranı ile etkileşime girdiklerinde zamanla kendilerini füzyon yoluyla bakterilerin membranına entegre etmeye meyillidirler. Dolayısıyla aktif madde hızlıca hücreye dağılarak burada etki göstermeye başlar. Bu da lipozomların arttırılmış antibakteriyel aktivitesini açıklamak için kullanılabilir.

Tohum çimlenme testine göre 14. günün sonunda en çok çimlenen set 73,75 µg/ml serbest juglon içeren; 0,625 mg/mL J/β-CD/L konsantrasyonunda formülasyon ile muamele edilmiş tohumlar olmuş ve çimlenme yüzdesi de %86,67 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre; elde edilen son formülasyonun domates patojenleri üzerinde öldürücü etkisi olduğu bilinen konsantrasyonlarda tohum çimlenmesini teşvik edici özellik gösterdiği görülmektedir.

Sonuç olarak juglonun/β-CD ile inklüzyon kompleksi oluşturması ve lipozomal enkapsülasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada hazırlanan lipozomal β-CD inklüzyon komplekslerinin uygun nano boyutta, monodispers bir dağılım gösteren ve kolloidal stabilitesi yüksek bir formülasyon olduğu belirlenmiştir. Yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip bu formülasyon; içindeki juglonu zamana bağlı kontrollü bir salım profili ile salmaktadır. Juglon/β-CD'in lipozomal enkapsülasyonu hidrofobik bir molekül olan juglonun çözünürlüğünü arttırmış ve maddenin biyoyararlanımını iyileştirmiştir. J/β-CD/L'nin her üç bakteri türü için de serbest juglona göre antibakteriyel aktivitesinin 2 kat daha fazla olması ve tohum çimlenmesi üzerine de tohumun çimlenmesini teşvik edecek olumlu etkilere sahip olması bu formülasyonu domates tohum patojenlerine karşı biyolojik mücadelede kullanılabilecek potansiyel bir nanobiyopestisit adayı yapmaktadır. Aynı zamanda geliştirilen J/β-CD/L; domates patojenlerine karşı sera çalışmalarında, domates bitkisi üzerinde yapılacak araştırmalar için *in-vitro* çalışmaları tamamlanmış bir deneme adayıdır.

KAYNAKLAR

Abarca, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. Food Chemistry, 196, 968–975. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.023

Abbas, Z. S., Sulaiman, G. M., Jabir, M. S., Mohammed, S. A. A., Khan, R. A., Mohammed, H. A., & Al-Subaiyel, A. (2022). Galangin/β-Cyclodextrin Inclusion Complex as a Drug-Delivery System for Improved Solubility and Biocompatibility in Breast Cancer Treatment. Molecules 2022, Vol. 27, Page 4521, 27(14), 4521. https://doi.org/10.3390/MOLECULES27144521

Abdollahdokht, D., Gao, Y., Faramarz, S., Poustforoosh, A., Abbasi, M., Asadikaram, G., & Nematollahi, M. H. (2022). Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 9(1), 1–19. https://doi.org/10.1186/S40538-021-00281-0/TABLES/4

Abreu, F. O. M. S., Oliveira, E. F., Paula, H. C. B., & De Paula, R. C. M. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. Carbohydrate Polymers, 89(4), 1277–1282. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.04.048

Acar, T., Arayici, P. P., Ucar, B., Coksu, I., Tasdurmazli, S., Ozbek, T., & Acar, S. (2023). Host-Guest Interactions of Caffeic Acid Phenethyl Ester with β-Cyclodextrins: Preparation, Characterization, and In Vitro Antioxidant and Antibacterial Activity. ACS Omega. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C07643/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C07643_0010.JPEG

Afzal, I., Javed, T., Amirkhani, M., & Taylor, A. G. (2020). Modern Seed Technology: Seed Coating Delivery Systems for Enhancing Seed and Crop Performance. Agriculture 2020, Vol. 10, Page 526, 10(11), 526. https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE10110526

Aithal, B. K., Sunil Kumar, M. R., Rao, B. N., Upadhya, R., Prabhu, V., Shavi, G., Arumugam, K., Sajankila, S. P., Udupa, N., Satyamoorthy, K., & Satish Rao, B. S. (2011). Evaluation of pharmacokinetic, biodistribution, pharmacodynamic, and toxicity profile of free juglone and its sterically stabilized liposomes. Journal of Pharmaceutical Sciences, 100(8), 3517–3528. https://doi.org/10.1002/JPS.22573

Ajeeshkumar, K. K., Aneesh, P. A., Raju, N., Suseela, M., Ravishankar, C. N., & Benjakul, S. (2021). Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. Comprehensive Reviews in Food Science

and Food Safety, 20(2), 1280–1306. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12725

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters, 8(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102/TABLES/2

Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 7(1), 3. https://doi.org/10.15171/APB.2017.002

Ali, N., Khan, S., Khan, M. A., Waqas, M., & Yao, H. (2019). Endocrine disrupting pesticides in soil and their health risk through ingestion of vegetables grown in Pakistan. Environmental Science and Pollution Research, 26(9), 8808–8820. https://doi.org/10.1007/S11356-019-04287-Y/TABLES/2

Al-Nasiri, G., Cran, M. J., Smallridge, A. J., & Bigger, S. W. (2018). Optimisation of β-cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool. Journal of Microencapsulation, 35(1), 26–35. https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1413147

Altuntaş, H., Duman, E., & Kılıç, G. (2020). Juglone induced oxidative and genotoxic stress in the model insect Galleria mellonella L. (Pyralidae: Lepidoptera). International Journal of Tropical Insect Science, 40(3), 611–619. https://doi.org/10.1007/S42690-020-00107-W/FIGURES/4

Andra, V. V. S. N. L., Pammi, S. V. N., Bhatraju, L. V. K. P., & Ruddaraju, L. K. (2022). A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. BioNanoScience, 12(1), 274–291. https://doi.org/10.1007/S12668-022-00941-X/TABLES/6

Arasoglu, T., Derman, S., Mansuroglu, B., Yelkenci, G., Kocyigit, B., Gumus, B., Acar, T., & Kocacaliskan, I. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles. Journal of Applied Microbiology, 123(6), 1407–1419. https://doi.org/10.1111/JAM.13601

Arasoglu, T., Mansuroglu, B., Derman, S., Gumus, B., Kocyigit, B., Acar, T., & Kocacaliskan, I. (2016a). Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) Using a Poly(d, l -lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticle System. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(38), 7087–7094. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B03309/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2016-033099_0005.GIF

Arasoglu, T., Mansuroglu, B., Derman, S., Gumus, B., Kocyigit, B., Acar, T., & Kocacaliskan, I. (2016b). Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) Using a Poly(d, l -lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticle System. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(38), 7087–7094.

https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B03309/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2016-033099_0005.GIF

Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., & Babalola, O. O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. Frontiers in Microbiology, 14, 1040901. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1040901/BIBTEX

Baldim, I., Oliveira, A. M., Souto, E. B., & Oliveira, W. P. (2022). Cyclodextrins-in-Liposomes: A Promising Delivery System for Lippia sidoides and Syzygium aromaticum Essential Oils. Life 2022, Vol. 12, Page 95, 12(1), 95. https://doi.org/10.3390/LIFE12010095

Bhagat, D., Samanta, S. K., & Bhattacharya, S. (2013). Efficient Management of Fruit Pests by Pheromone Nanogels. Scientific Reports 2013 3:1, 3(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/srep01294

Cai, A. Y., Zhu, Y. J., & Qi, C. (2020). Biodegradable Inorganic Nanostructured Biomaterials for Drug Delivery. Advanced Materials Interfaces, 7(20), 2000819. https://doi.org/10.1002/ADMI.202000819

Cao, L., Zhang, H., Zhou, Z., Xu, C., Shan, Y., Lin, Y., & Huang, Q. (2018). Fluorophore-free luminescent double-shelled hollow mesoporous silica nanoparticles as pesticide delivery vehicles. Nanoscale, 10(43), 20354–20365. https://doi.org/10.1039/C8NR04626C

Cavalcanti, I. M. F., Mendona, E. A. M., Lira, M. C. B., Honrato, S. B., Camara, C. A., Amorim, R. V. S., Filho, J. M., Rabello, M. M., Hernandes, M. Z., Ayala, A. P., & Santos-Magalhães, N. S. (2011). The encapsulation of β-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 44(3), 332–340. https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2011.08.011

Cemen, A., Saygili, H., Horuz, S., & Aysan, Y. (2018). Potential Of Bacteriophages To Control Bacterıal Speck Of Tomato (Pseudomonas syringae pv. tomato). Fresenius Environmental Bulletin, 27, 9366–9373.

Chariou, P. L., Dogan, A. B., Welsh, A. G., Saidel, G. M., Baskaran, H., & Steinmetz, N. F. (2019). Soil mobility of synthetic and virus-based model nanopesticides. Nature Nanotechnology 2019 14:7, 14(7), 712–718. https://doi.org/10.1038/s41565-019-0453-7

Chaudhary, P., Sharma, A., Singh, B., & Nagpal, A. K. (2018). Bioactivities of phytochemicals present in tomato. Journal of Food Science and Technology, 55(8), 2833–2849. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z

Chen, G., Li, D., Jin, Y., Zhang, W., Teng, L., Bunt, C., & Wen, J. (2014). Deformable liposomes by reverse-phase evaporation method for an enhanced skin delivery of (+)-catechin. Drug Development and

Industrial Pharmacy, 40(2), 260–265. https://doi.org/10.3109/03639045.2012.756512

Chen, X., Chen, R., Guo, Z., Li, C., & Li, P. (2007). The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β-cyclodextrin. Food Chemistry, 101(4), 1580–1584. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.04.020

Cheng, X., Yan, H., Pang, S., Ya, M., Qiu, F., Qin, P., Zeng, C., & Lu, Y. (2022). Liposomes as Multifunctional Nano-Carriers for Medicinal Natural Products. Frontiers in Chemistry, 10. https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.963004

Christin Ayuning Putri, D., Dwiastuti, R., & Kharis Nugroho, A. (2017). OPTIMIZATION OF MIXING TEMPERATURE AND SONICATION DURATION IN LIPOSOME PREPARATION. 14(2), 2527–7146. https://doi.org/10.24071/jpsc.142728

CLSI. (2018). CLSI M07-Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute . https://clsi.org/terms-of-use/.

Coksu, I., Dokuz, S., Akgul, B., Ozbek, T., Abamor, E. S., Duranoglu, D., & Acar, S. (2024). Enhancing the treatment of Staphylococcus aureus infections: A nanosystem with including dual antimicrobial peptide. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 97, 105830. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2024.105830

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics 2018, Vol. 10, Page 57, 10(2), 57. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057

Daniel Teoh Chuan, T., Hasnah, O., Suriyati, M., Azlina Harun, K., Osman, H., Mohamad, S., Harun Kamaruddin, A., & Teoh Chuan Tan, D. (2012). Synthesis and Antibacterial Activity of Juglone Derivatives. J. Chem. Chem. Eng, 6, 84–89. https://www.researchgate.net/publication/272051079

De Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., Gonçalves Da Silva, C. M., Pasquoto, T., Lima, R., & Fraceto, L. F. (2015). Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: Preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(2), 422–432. https://doi.org/10.1021/JF5059045/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2014-059045_0011.GIF

Dymek, M., & Sikora, E. (2022). Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – the current state. Advances in Colloid and Interface Science, 309, 102757. https://doi.org/10.1016/J.CIS.2022.102757

Elsana, H., Olusanya, T. O. B., Carr-wilkinson, J., Darby, S., Faheem, A., & Elkordy, A. A. (2019). Evaluation of novel cationic gene based liposomes with cyclodextrin prepared by thin film hydration and

microfluidic systems. Scientific Reports 2019 9:1, 9(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51065-4

Erisen, S., Arasoğlu, T., Mansuroglu, B., Kocacaliskan, I., & Derman, S. (2020). Cytotoxic and mutagenic potential of juglone: a comparison of free and nano-encapsulated form. Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju, 71(1), 69–77. https://doi.org/10.2478/AIHT-2020-71-3344

Erler, F. (2000). Bitki kökenli bileşiklerin böcek ve akarlarla mücadelede kullanılma potansiyeli üzerine araştırmalar. http://acikerisim.akdeniz.edu.tr/xmlui/handle/123456789/620

Essiedu, J. A., Adepoju, F. O., & Ivantsova, M. N. (2020). Benefits and limitations in using biopesticides: A review. AIP Conference Proceedings, 2313(1). https://doi.org/10.1063/5.0032223/963419

Farimaz, A., Horuz, S., & Aysan, Y. (2014). Çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına etkisi. Turkish Journal of Biological Control, 5(1), 31–38. https://dergipark.org.tr/en/pub/tbmd/issue/22439/240106

Feng, J., Zhang, Q., Liu, Q., Zhu, Z., McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Application of Nanoemulsions in Formulation of Pesticides. Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization, 379–413. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00012-6

Fischer, T. C., Gosch, C., Mirbeth, B., Gselmann, M., Thallmair, V., & Stich, K. (2012). Potent and specific bactericidal effect of juglone (5-Hydroxy-1,4- naphthoquinone) on the fire blight pathogen erwinia amylovora. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(49), 12074–12081. https://doi.org/10.1021/JF303584R/SUPPL_FILE/JF303584R_SI_001.PDF

Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchen, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. The FASEB Journal, 28(3), 1317–1330. https://doi.org/10.1096/FJ.13-235440

Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (Solanum lycopersicum L.) in the service of biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 120(3), 881–902. https://doi.org/10.1007/S11240-014-0664-4/TABLES/2

Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. Carbohydrate Polymers, 129, 175–186. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.04.048

Glare, T. R., Gwynn, R. L., & Moran-Diez, M. E. (2016). Development of Biopesticides and Future Opportunities. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1477, 211–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6_16

Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. International Journal

of Pharmaceutics, 601, 120571. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120571

Hagiwara, Y., Arima, H., Hirayama, F., & Uekama, K. (2006). Prolonged retention of doxorubicin in tumor cells by encapsulation of γ-cyclodextrin complex in pegylated liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 56(1–2), 65–68. https://doi.org/10.1007/S10847-006-9062-9/METRICS

Halwani, M., Mugabe, C., Azghani, A. O., Lafrenie, R. M., Kumar, A., & Omri, A. (2007). Bactericidal efficacy of liposomal aminoglycosides against Burkholderia cenocepacia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60(4), 760–769. https://doi.org/10.1093/JAC/DKM289

Han, Q., Feng, L., Zhang, Y., Zhang, R., Wang, G., & Zhang, Y. (2021). Effect of Juglone against Pseudomonas syringae pv Actinidiae Planktonic Growth and Biofilm Formation. Molecules, 26(24), 7580. https://doi.org/10.3390/molecules26247580

Han, Q., Yan, X., Zhang, R., Wang, G., & Zhang, Y. (2021). Juglone Inactivates Pseudomonas aeruginosa through Cell Membrane Damage, Biofilm Blockage, and Inhibition of Gene Expression. Molecules, 26(19), 5854. https://doi.org/10.3390/molecules26195854

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. www.atcc.org

Islam, A. K. M. M., & Widhalm, J. R. (2020). Agricultural Uses of Juglone: Opportunities and Challenges. Agronomy, 10(10), 1500. https://doi.org/10.3390/agronomy10101500

Jash, A., Ubeyitogullari, A., & Rizvi, S. S. H. (2021). Liposomes for oral delivery of protein and peptide-based therapeutics: challenges, formulation strategies, and advances. Journal of Materials Chemistry B, 9(24), 4773–4792. https://doi.org/10.1039/D1TB00126D

Jhan, S., & Pethe, A. M. (2020). Double-loaded liposomes encapsulating lycopene β-cyclodextrin complexes: preparation, optimization, and evaluation. Journal of Liposome Research, 30(1), 80–92. https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1593450

Jiang, L., Yang, J., Wang, Q., Ren, L., & Zhou, J. (2019). Physicochemical properties of catechin/β-cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation. CyTA - Journal of Food, 17(1), 544–551. https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1612948

Kachhawa D. (2017). Microorganisms as a biopesticides. ~ 468 ~ Journal of Entomology and Zoology Studies, 5(3), 468–473.

Kalliora, C., Mamoulakis, C., Vasilopoulos, E., Stamatiades, G. A., Kalafati, L., Barouni, R., Karakousi, T., Abdollahi, M., & Tsatsakis, A. (2018). Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. Toxicology and Applied Pharmacology, 346, 58–75. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.025

Karabüyük, F., & Aysan, Y. (2019). Bazı Bitki Ekstraktlarının Pseudomonas syringae pv. tomato'nun Neden olduğu Domates Bakteriyel Benek Hastalığına

Antibakteriyel Etkisi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 16(2), 231–243. https://doi.org/10.33462/JOTAF.529499

Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M. N., & Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 368(1927), 4439–4451. https://doi.org/10.1098/RSTA.2010.0175

Kolomiets, J. V., Grygoryuk, I. P., & Butsenko, L. M. (2017). Bacterial diseases of tomato plants in terms of open and covered growing of Ukraine. Annals of Agrarian Science, 15(2), 213–216. https://doi.org/10.1016/J.AASCI.2017.05.010

Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z., & Ho, R. J. Y. (2014). Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. Journal of Pharmaceutical Sciences, 103(1), 29–52. https://doi.org/10.1002/JPS.23773

Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. Plants 2021, Vol. 10, Page 1185, 10(6), 1185. https://doi.org/10.3390/PLANTS10061185

Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A. A., & Kim, K. H. (2019). Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. Journal of Controlled Release, 294, 131–153. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.12.012

Lengai, G. M. W., Muthomi, J. W., Lengai, G. M. W., & Muthomi, J. W. (2018). Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. Journal of Biosciences and Medicines, 6(6), 7–41. https://doi.org/10.4236/JBM.2018.66002

Lira, M. C. B., Ferraz, M. S., da Silva, D. G. V. C., Cortes, M. E., Teixeira, K. I., Caetano, N. P., Sinisterra, R. D., Ponchel, G., & Santos-Magalhães, N. S. (2009). Inclusion complex of usnic acid with β-cyclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 64(3–4), 215–224. https://doi.org/10.1007/S10847-009-9554-5/FIGURES/6

Liu, X., Cao, A., Yan, D., Ouyang, C., Wang, Q., & Li, Y. (2021). Overview of mechanisms and uses of biopesticides. International Journal of Pest Management, 67(1), 65–72. https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789

LI, C. xi, FENG, S. li, SHAO, Y., JIANG, L. na, LU, X. yang, & HOU, X. li. (2007). Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. Journal of Environmental Sciences, 19(6), 725–732. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60121-1

Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. Pharmaceutics 2022, Vol. 14, Page 543, 14(3), 543. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14030543

Mangolim, C. S., Moriwaki, C., Nogueira, A. C., Sato, F., Baesso, M. L., Neto, A. M., & Matioli, G. (2014). Curcumin–β-cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. Food Chemistry, 153, 361–370. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.12.067

Moghadaszadeh, M., Khayyati, M., Spotin, A., Norouzi, R., Pagheh, A. S., Oliveira, S. M. R., Pereira, M. de L., & Ahmadpour, E. (2021). Scolicidal and Apoptotic Activities of 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone as a Potent Agent against Echinococcus granulosus Protoscoleces. Pharmaceuticals, 14(7). https://doi.org/10.3390/PH14070623

Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. Frontiers in Public Health, 4, 178764. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2016.00148/BIBTEX

Olatunde, O. O., Benjakul, S., Vongkamjan, K., & Amnuaikit, T. (2019). Liposomal Encapsulated Ethanolic Coconut Husk Extract: Antioxidant and Antibacterial Properties. Journal of Food Science, 84(12), 3664–3673. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14853

Pang, L., Gao, Z., Feng, H., Wang, S., & Wang, Q. (2019). Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: A review of modifications and applications. Journal of Controlled Release, 316, 105–115. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2019.11.004

Pedrini, S., Merritt, D. J., Stevens, J., & Dixon, K. (2017). Seed Coating: Science or Marketing Spin? Trends in Plant Science, 22(2), 106–116. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002

Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C. F. R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., & Estevinho, L. (2007). Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11), 2287–2295. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.004

Peritore-Galve, F. C., Miller, C., & Smart, C. D. (2020). Characterizing colonization patterns of clavibacter michiganensis during infection of tolerant wild solanum species. Phytopathology, 110(3), 574–581. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-19-0329-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-09-19-0329-R_F4.JPEG

Peritore-Galve, F. C., Tancos, M. A., & Smart, C. D. (2021). Bacterial canker of tomato: Revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. Plant Disease, 105(6). https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1732-FE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-08-20-1732-FEBIO3.JPEG

Petrakis, D., Vassilopoulou, L., Mamoulakis, C., Psycharakis, C., Anifantaki, A., Sifakis, S., Docea, A., Tsiaoussis, J., Makrigiannakis, A., & Tsatsakis, A. (2017). Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(10), 1282. https://doi.org/10.3390/ijerph14101282

Rani, R., Sethi, K., Kumar, S., Varma, R. S., & Kumar, R. (2022). Natural naphthoquinones and their derivatives as potential drug molecules against trypanosome parasites. Chemical Biology & Drug Design, 100(6), 786–817. https://doi.org/10.1111/CBDD.14122

Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., & Herrero Hernández, E. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. Cortex, 74, 417–426. https://doi.org/10.1016/J.CORTEX.2015.10.003

Schiavi, D., Balbi, R., Giovagnoli, S., Camaioni, E., Botticella, E., Sestili, F., & Balestra, G. M. (2021). A Green Nanostructured Pesticide to Control Tomato Bacterial Speck Disease. Nanomaterials 2021, Vol. 11, Page 1852, 11(7), 1852. https://doi.org/10.3390/NANO11071852

Sen, Y., Van Der Wolf, J., Visser, R. G. F., & Van Heusden, S. (2014). Bacterial Canker of Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, Resistance, and Interactions. Https://Doi.Org/10.1094/PDIS-05-14-0499-FE, 99(1), 4–13. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0499-FE

Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. Frontiers in Pharmacology, 6(DEC), 163819. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00286/BIBTEX

Shaji, J., & Iyer, S. (2012). Double-loaded liposomes encapsulating Quercetin and Quercetin beta-cyclodextrin complexes: Preparation, characterization and evaluation. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP), 6(3). https://doi.org/10.22377/AJP.V6I3.58

Singh, S., Singh, D. R., Kumar, K., & Birah, A. (2014). Eco-friendly management modules for bacterial wilt (Ralstonia solanacearum) of tomato for protected cultivation in a tropical island ecosystem. Biological Agriculture & Horticulture, 30(4), 219–227. https://doi.org/10.1080/01448765.2014.913263

Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. Journal of Controlled Release, 252, 28–49. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.03.008

Stall, R. E., Jones, J. B., & Minsavage, G. V. (2009). Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. Annual Review of Phytopathology, 47(Volume 47, 2009), 265–284. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080508-081752/CITE/REFWORKS

Šturm, L., & Ulrih, N. P. (2021). Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 6547, 22(12), 6547. https://doi.org/10.3390/IJMS22126547

Tang, Y. T., Li, Y., Chu, P., Ma, X. D., Tang, Z. Y., & Sun, Z. L. (2022). Molecular biological mechanism of action in cancer therapies: Juglone and its derivatives, the future of development. Biomedicine &

Pharmacotherapy, 148, 112785. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.112785

Teixeira, M. C., Carbone, C., & Souto, E. B. (2017). Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery. Progress in Lipid Research, 68, 1–11. https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2017.07.001

Tripathi, S., Srivastava, P., Devi, R. S., & Bhadouria, R. (2020). Influence of synthetic fertilizers and pesticides on soil health and soil microbiology. Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers, 25–54. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00002-7

Ţucureanu, V., Matei, A., & Avram, A. M. (2016). FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 46(6), 502–520. https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013

Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., & Caiment, F. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. Scientific Reports 2019 9:1, 9(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0

Vurro, M., Miguel-Rojas, C., & Pérez-de-Luque, A. (2019). Safe nanotechnologies for increasing the effectiveness of environmentally friendly natural agrochemicals. Pest Management Science, 75(9), 2403–2412. https://doi.org/10.1002/PS.5348

Wadhwa, G., Kumar, S., Chhabra, L., Mahant, S., & Rao, R. (2017). Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 89(1–2), 39–58. https://doi.org/10.1007/S10847-017-0744-2/TABLES/5

Wang, H., Hutton, S. F., Robbins, M. D., Sim, S.-C., Scott, J. W., Yang, W., Jones, J. B., & Francis, D. M. (2020). Advances and Challenges in Bacterial Spot Resistance Breeding in Tomato (Solanum lycopersicum L.). International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 1734, 21(5), 1734. https://doi.org/10.3390/IJMS21051734

Wang, Y., Zhang, Y., Gao, Z., & Yang, W. (2018). Breeding for Resistance to Tomato Bacterial Diseases in China: Challenges and Prospects. Horticultural Plant Journal, 4(5), 193–207. https://doi.org/10.1016/J.HPJ.2018.08.004

Xiang, B., & Cao, D.-Y. (2018). Preparation of Drug Liposomes by Thin-Film Hydration and Homogenization. Liposome-Based Drug Delivery Systems, 1–11. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_2-1

Yadav, R. K., Singh, N. B., Singh, A., Yadav, V., Bano, C., Khare, S., & Niharika. (2020). Expanding the horizons of nanotechnology in agriculture: recent advances, challenges and future perspectives. Vegetos, 33(2), 203–221. https://doi.org/10.1007/S42535-019-00090-9/FIGURES/3

Yaman, C., Uranbey, S., Abdullah Ahmed AHMED, H., Başalma, D., Bozok Üniversitesi, Y., Fakültesi, Z., Bitkileri Bölümü, T., Üniversitesi, A., Yazar, S., Author, C., & Agric Res, T. J. (2021). Bazı Alkanna Türlerinin Tohum Canlılık Testi, Çimlenme Oranı ve In Vitro Rejenerasyonu. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 8(2), 220–227. https://doi.org/10.19159/tutad.892928

Zhang, H. (2017). Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. Methods in Molecular Biology, 1522, 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2

Zhang, X. H., Yu, X. Z., & Yue, D. M. (2016). Phytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to rice seedlings. International Journal of Environmental Science and Technology, 13(2), 607–614. https://doi.org/10.1007/S13762-015-0899-6/FIGURES/3

Zhao, X., Cui, H., Wang, Y., Sun, C., Cui, B., & Zeng, Z. (2018). Development Strategies and Prospects of Nano-based Smart Pesticide Formulation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(26), 6504–6512. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B02004/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2017-02004J_0011.GIF

Zhao, X., Luo, G., Bai, C., Peng, H., & Xiong, H. (2016). Juglone thermosensitive liposomes: Preparation, characterization, in vitro release and hyperthermia cell evaluation. International Journal of Food Engineering, 12(5), 429–438.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad **:** Kübra SAYARIM

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Sayarım K.,** Acar S., Çağal M. M. "Development of Liposomal Juglone Formulation and Determination of its Antibacterial Activity". 5th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT) Congress. 2023. (Poster Sunumu)

DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Sayarım K.,** Tüney Kızılkaya İ., Kahraman M., Çağal M. M. "Silver Nanoparticles from The Brown Algae Cystoseira barbata: An Optimization Study and Their Characterization". 4th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT) Congress. 2022. (Sözlü Sunum)
- Çağal M. M., **Sayarım K.,** Tüney Kızılkaya İ., Kahraman M. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Marine Red Algae Grateloupia Subpectinata and Their Antibacterial Activity". 4th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT) Congress. 2022. (Poster Sunumu)
- Ak E., **Sayarım K.,** Tüney Kızılkaya İ., Çağal M. M. "Antioxidant Activity of Liposomal Formulation of Ethanol and Aqueous Extracts of Ulva lactuca". 4th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT) Congress. 2022. (Poster Sunumu)