

**FERULİK ASİT YÜKLÜ PLGA BAZLI
NANOSİSTEMLERİN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN VE
ANTİALZHEİMER ETKİNLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Kübra Nur ARINMIŞ

Eskişehir 2023

**FERULİK ASİT YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN VE
ANTİALZHEİMER ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

KÜBRA NUR ARINMIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kübra Nur ARINMIŞ'ın "Ferulik asit yüklü PLGA bazlı nanosistemlerin hazırlanması, karakterizasyonu, antioksidan ve antialzheimer etkinliklerinin belirlenmesi" başlıklı tezi 07/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK
Üye	: Doç. Dr. Evrim AKYIL
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve GÜVEN

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

FERULİK ASİT YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU, ANTIOKSİDAN VE ANTİALZHEİMER ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kübra Nur ARINMIŞ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Nanopartikül sistemler modifiye salım özelliği, terapötik etkinliğin artırılması ve yan etkilerin azaltılması gibi avantajları sayesinde son yıllarda araştırmacılar tarafından ilgi görmektedir. Ferulik asit, antiinflamatuvar, antialzheimer, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antihiperlipidemik, antidiyabetik gibi terapötik etkilere sahiptir. Bu çalışmada ferulik asit yüklü PLGA bazlı nanopartiküller nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmış ve Poloksamer® 188 ve Span 60®'ın değişen konsantrasyonlarının nanopartikülün özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon optimum seçilmiştir. Ferulik asitin su fazına düşük ilgisi ve dolayısıyla organik faza geç etme eğiliminde olan lipofilik yapısından dolayı yüksek enkasülasyon etkinliği elde edilmiştir. A-FA kodlu formülasyondan ferulik asit salımı saf ferulik asite göre daha yavaş ve 24 saatlik uzatılmış salım yaptığı belirlenmiştir. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun biyolojik aktivite çalışmalarıyla antioksidan ve antialzheimer etkileri incelenmiştir. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu kuvvetli DDPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} kation renksizleştirici ve redükleyici antioksidan aktivite göstermiştir. Anti-alzheimer aktivite sonuçlarına göre hem AChE inhibitörü hem de antioksidan özelliğe sahip olması tedavide önem taşıdığından bu tez çalışmasında hazırlanan formülasyonun hem oksidatif stres kaynaklı hastalıkların hem de Alzheimer tedavisinde umut vadettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ferulik asit, PLGA, Nanopartikül, Alzheimer, Antioksidan.

ABSTRACT

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIALZHEIMER EFFECTS OF FERULIC ACID LOADED PLGA-BASED NANOSYSTEMS

Kübra Nur ARINMIŞ

Department of Pharmaceutical Technology
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Nanoparticle systems have attracted attention by researchers in recent years due to their advantages such as modified release feature, increasing therapeutic efficacy and reducing side effects. Ferulic acid has therapeutic effects such as anti-inflammatory, anti-alzheimer's, antioxidant, antimicrobial, anticancer, antihyperlipidemic, antidiabetic. In this study, ferulic acid loaded PLGA-based nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method and the effect of varying concentrations of Poloxamer[®] 188 and Span 60[®] on nanoparticle properties was investigated. A-FA coded formulation loaded with ferulic acid was chosen as optimum. High encasing efficiency has been achieved due to the low affinity of ferulic acid to the water phase and therefore its lipophilic nature, which tends to migrate to the organic phase. It was determined that the release of ferulic acid from the formulation coded A-FA was slower than pure ferulic acid and prolonged release in 24 hours. Antioxidant and antialzheimer's effects of A-FA coded nanoparticle formulation were investigated by biological activity studies. A-FA coded nanoparticle formulation showed strong DDPH free radical scavenging, ABTS^{•+} cation decolorizing and reducing antioxidant activity. Since it has both AChE inhibitor and antioxidant properties according to the results of its anti-alzheimer activity, it was concluded that the formulation prepared in this thesis study shows promise in the treatment of both oxidative stress-related diseases and Alzheimer's.

Keywords: Ferulic acid, PLGA, Nanoparticle, Antialzheimer, Antioxidant.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında engin bilgi, deneyim ve tecrübelerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam saygıdeğer Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin *in vitro* antialzheimer ve antioksidan etkinlik çalışmalarında bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca, her konuda beni destekleyen, bilgisini, tecrübesini inancını benden esirgemeyen, benim kendime inanmadığım zamanlarda bile her zaman bana inanan, güvenen değerli ablam Bilg. Yük. Müh. Sündüs ARINMIŞ UZUN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde desteğini esirgemeyen yakın arkadaşım ve değerli meslektaşım Ecz. Ayşegül PEKDEMİR'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde manevi desteğini esirgemeyen değerli yakın arkadaşım Kim. Muhammed AZKIN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim ve öğrenim sürecimde bilgi, ilgi, tecrübelerini, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıklarını her daim arkamda hissettiğim, her koşulda yanımda olan, kendimi şanslı hissetmemi sağlayan çok değerli aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Kübra Nur ARINMIŞ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

(İmza)

Kübra Nur ARINMIŞ

(Adı-Soyadı)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Nanopartiküller	2
2.1.1. Polimerik nanopartiküller.....	2
2.1.1.1. Polimerik nanopartiküllerin avantajları.....	2
2.1.2. Polimerik nanaopartiküllerde kullanılan polimerler.....	3
2.1.3. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması.....	4
2.1.3.1. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi	4
2.1.3.2. Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi	5
2.1.3.3. Emülsiyon çözücü difüzyon yöntemi.....	6
2.1.3.4. Tuzla çöktürme yöntemi	6
2.1.3.5. Diyaliz.....	7
2.1.3.6. Faz ayrımı – koaservasyon yöntemi	8
2.1.3.7. Süperkritik akışkan teknolojisi.....	9
2.1.3.8. Nanoçöktürme yöntemi.....	9
2.1.4. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu	11
2.1.4.1. Parçacık boyutu ve dağılımı	11
2.1.4.2. Zeta potansiyeli	11

2.1.4.3. <i>In vitro</i> dissolüsyon.....	12
2.1.4.3.1. Membran difüzyon yöntemi.....	12
2.1.4.3.2. Numune alma ve ayırma yöntemi.....	13
2.1.4.3.3. Sürekli akış yöntemi.....	13
2.2. PLGA.....	14
2.2.1. Resomer® RG 503 H'nin özellikleri.....	15
2.2.2. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması.....	17
2.2.3. PLGA fizikokimyasal özellikleri.....	17
2.2.4. PLGA'nın biyolojik ayrışması.....	18
2.3. Fenolik Bileşikler.....	18
2.3.1. Ferulik asit.....	18
2.3.1.1. Ferulik asidin terapötik etkileri.....	19
2.3.1.1.1. Ferulik asidin antidiyabetik etkisi.....	19
2.3.1.1.2. Ferulik asidin antikanser etkisi.....	20
2.3.1.1.3. Ferulik asidin kardiyovasküler etkisi.....	20
2.3.1.1.4. Ferulik asidin antialzheimer özelliği.....	20
2.3.1.1.5. Ferulik asidin antioksidan özelliği.....	22
2.3.1.2. Ferulik asidin özellikleri.....	25
2.3.1.2.1. Ferulik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	25
2.3.1.2.2. Ferulik asidin farmakokinetiği.....	25
2.3.1.2.3. Ferulik asidin toksisitesi.....	26
3. GEREÇLER.....	27
3.1. Kullanılan Maddeler.....	27
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	28
4. YÖNTEM.....	29
4.1. UV Spektrofotometre validasyon çalışmaları.....	29

4.1.1. Ferulik asit için Aseton : Su (1:1, h/h) ortamında validasyon çalışması	29
.....
4.1.1.1. Absorbans belirleme çalışmaları	29
4.1.1.2. Doğrusallık	29
4.1.1.3. Kesinlik	30
4.1.1.4. Doğruluk	30
4.1.1.5. Duyarlılık	30
4.1.1.6. Seçicilik	31
4.1.2. Ferulik asit için %1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması	31
.....
4.1.2.1. Absorbans belirleme çalışmaları	31
4.1.2.2. Doğrusallık	31
4.1.2.3. Kesinlik	31
4.1.2.4. Doğruluk	32
4.1.2.6. Duyarlılık	32
4.1.2.6. Seçicilik	32
4.2. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması	32
.....
4.2.1. A-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	34
4.2.2. B-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	34
4.2.3. C-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	34
4.2.4. D-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	35
4.2.5. E-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	35
4.2.6. F-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	36
4.2.7. G-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	36
4.2.8. H-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	36
4.2.9. I-Blank kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	37

4.2.10. A-FA kodlu ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonunun hazırlanması	37
4.3. Nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.....	38
4.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel.....	38
4.3.2 Dondurma ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) üzerinde kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi	38
4.3.2.1 Dondurma işlemine trehaloz etkisi.....	38
4.3.2.2. Liyofilizasyon işlemine trehaloz etkisi.....	39
4.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme	39
4.3.4. Enkapsülasyon etkinliği	40
4.3.5. In vitro dissolüsyon.....	40
4.3.6. Salım Kinetiği	41
4.4. Katı hal karakterizasyonları	41
4.4.1. Termal analiz.....	41
4.4.2. FT-IR	42
4.4.3. ¹ H-NMR	42
4.5. Antioksidan etkinlik çalışmaları.....	42
4.5.1. ABTS●+ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi.....	42
4.5.2. Redükleyici güç ölçümü	43
4.5.3. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem	43
4.6. In vitro AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etkinin ölçülmesi.....	44
5. BULGULAR	46
5.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları.....	46
5.1.1. Ferulik asit için Aseton: Su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması.....	46
5.1.1.1. Absorbans belirleme.....	46

	<u>Sayfa</u>
5.1.1.2. Doğrusallık.....	46
5.1.1.3. Kesinlik.....	48
5.1.1.4. Doğruluk	50
5.1.1.5. Duyarlılık.....	51
5.1.1.6. Seçicilik	51
5.1.2. Ferulik asit için % 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması.....	53
5.1.2.1. Absorbans belirleme.....	53
5.1.2.2. Doğrusallık.....	53
5.1.2.3. Kesinlik.....	54
5.1.2.4. Doğruluk	57
5.1.2.5. Duyarlılık.....	58
5.1.2.6. Seçicilik	58
5.2. Blank nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu	59
5.2.1. Blank formülasyonların parçacık boyut analizi.....	59
5.2.2. Blank formülasyonların parçacık boyut dağılım (PDI) analizi.....	61
5.2.3. Blank formülasyonların zeta potansiyel analizi.....	66
5.3. Ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonunun karakterizasyonu	72
5.4. Dondurma ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) üzerinde trehaloz etkisi ve saklama koşulunun belirlenmesi.....	74
5.4.1. Dondurma işlemine etkisi trehaloz etkisi.....	74
5.4.1.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı.....	74
5.4.1.2. Zeta potansiyel	76
5.5. Liyofilizasyon işlemine trehaloz etkisi.....	78
5.5.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı	78
5.5.2. Zeta potansiyel.....	81

5.6. Gastrointestinal stabilite değerlendirme.....	83
5.7. Enkapsülasyon etkinliği.....	85
5.8. <i>In vitro</i> dissolüsyon.....	85
5.9. Salım Kinetiği	87
5.10. Katı hal karakterizasyonları	99
5.10.1. Termal analiz.....	99
5.10.2. FT-IR analizleri.....	101
5.10.3. ¹ H-NMR analizleri.....	104
5.11. Antioksidan etkinlik çalışmaları.....	110
5.11.1. ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal kation renksizleştirme yöntemi sonuçları	110
5.11.2. Redükleyici güç sonuçları	110
5.11.3. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem sonuçları.....	111
5.12. <i>In vitro</i> AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etkinin ölçülmesi.....	111
5.12.1. AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları	111
5.12.2. BChE İnhibitör Aktivite Sonuçları	112
6. TARTIŞMA.....	113
6.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları.....	113
6.1.1. Ferulik asit için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması	113
6.1.2. Ferulik asit için % 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması.....	115
6.2. Nanopartikül formülasyonların hazırlanması.....	117
6.3. Nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.....	118
6.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel	118
6.3.2. Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi	121
6.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme.....	122

	<u>Sayfa</u>
6.3.4. <i>Enkapsülasyon etkinliği</i>	123
6.3.5. <i>In vitro dissolüsyon</i>	123
6.3.6. <i>Salım Kinetiği</i>	124
6.4. Katı hal karakterizasyonları	125
6.4.1. <i>Termal analiz</i>	125
6.4.2. <i>FT-IR analizleri</i>	125
6.4.3. <i>¹H-NMR analizleri</i>	126
6.5. Biyolojik aktivite çalışmaları	127
7. SONUÇ	129
KAYNAKÇA.....	131
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler	4
Tablo 2.2. Resomor® R polimer çeşitleri	16
Tablo 2.3. Resomor® RG polimer çeşitleri	16
Tablo 4.1. Formülasyon ön denemelerinde hazırlanan formülasyon içerikleri	33
Tablo 4.2. Optimum olarak seçilen formülasyonun içeriği.....	33
Tablo 5.1. Yöntem doğrusalılık sonuçları.....	47
Tablo 5.2. 4.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları.....	48
Tablo 5.3. 6.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları.....	49
Tablo 5.4. 8.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları.....	50
Tablo 5.5. Yöntemin doğruluk sonuçları	51
Tablo 5.6. Doğrusallık çalışması sonuçları	54
Tablo 5.7. 4.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları.....	55
Tablo 5.8. 6.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları.....	56
Tablo 5.9. 8.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları.....	57
Tablo 5.10. Yöntemin doğruluk sonuçları	58
Tablo 5.11. Blank formülasyonların parçacık boyut sonuçları	60
Tablo 5.12. Blank formülasyonların parçacık boyut dağılım (PDI) sonuçları.....	61
Tablo 5.13. Blank formülasyonların zeta potansiyel sonuçları.....	67
Tablo 5.14. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel sonuçları.....	73

Tablo 5.15. Dondurma işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu (PDI) üzerindeki etkisi	75
Tablo 5.16. Dondurma işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etkisi.....	77
Tablo 5.17. Liyofilizasyon işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu (PDI) üzerindeki etkisi	78
Tablo 5.18. Liyofilizasyon işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etkisi	81
Tablo 5.19. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonun gastrointestinal stabilite sonuçları	83
Tablo 5.20. Ferulik asit ve A-FA kodlu formülasyon için % kümülatif salım verileri..	85
Tablo 5.21. A-FA kodlu formülasyon için 24 saatlik salım kinetiği sonuçları.....	88
Tablo 5.22. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank için ABTS●+ yöntemi aktivite sonuçları	110
Tablo 5.23. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank için Redükleyici güç yöntemi aktivite sonuçları.....	111
Tablo 5.24. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank için DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi aktivite sonuçları.....	111
Tablo 5.25. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank formülasyonun AChE inhibitör aktivite sonuçları.....	112
Tablo 5.26. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank formülasyonun BChE inhibitör aktivite sonuçları.....	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi	5
Şekil 2.2. Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi	6
Şekil 2.3: Diyaliz yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi	8
Şekil 2.4. Nanoçöktürme yöntemi şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.5. Farklı diyaliz yöntemleri. a. Diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi b. Ters diyaliz kesesi yöntemi şematik gösterimi c. Yan yana diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.6. Sürekli akış yönteminin, kapalı ve açık sistem olarak şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.7. PLGA'nın hidrolizi	15
Şekil 2.8. Ferulik asit kimyasal yapısı	19
Şekil 2.9. Alzheimer hastalığında potansiyel uygulamalar açısından ferulik asit ve türevlerinin terapötik kullanımları	21
Şekil 2.10. KMS4001'in yapısı.....	22
Şekil 2.11. Ferulik asidin antioksidan etkisinde yer alan moleküler yollar.....	23
Şekil 2.12. Ferulik asidin antioksidan özellikleri	24
Şekil 5.1. Ferulik asit'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{max} = 326.0$ nm).....	46
Şekil 5.2. Ferulik asit'in aseton: su (1:1 h/h) ortamında standart eğrisi.....	47
Şekil 5.3. Ferulik asit'e ait spektrum.....	52
Şekil 5.4. A-Blank kodlu formülasyona ait spektrum	52

Şekil 5.5. Ferulik asit'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{max} = 307.0$ nm).....	53
Şekil 5.6. Ferulik asit'in %1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında standart eğrisi...	54
Şekil 5.7. Ferulik asit'e ait spektrum.....	59
Şekil 5.8. A-Blank kodlu formülasyona ait spektrum	59
Şekil 5.9. Blank formülasyonların parçacık boyut değerleri grafiği	60
Şekil 5.10. Blank formülasyonların parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri grafiği..	62
Şekil 5.11. A-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	62
Şekil 5.12. B-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	63
Şekil 5.13. C-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	63
Şekil 5.14. D-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	64
Şekil 5.15. E-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	64
Şekil 5.16. F-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	65
Şekil 5.17. G-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	65
Şekil 5.18. H-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	66
Şekil 5.19. I-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	66
Şekil 5.20. Blank formülasyonların zeta potansiyel değerleri grafiği	68
Şekil 5.21. A-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	68
Şekil 5.22. B-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	69
Şekil 5.23. C-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	69
Şekil 5.24. D-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	70

Şekil 5.25. E-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	70
Şekil 5.26. F-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	71
Şekil 5.27. G-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	71
Şekil 5.28. H-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	72
Şekil 5.29. I-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	72
Şekil 5.30. A-FA için Zetasizer Nano ZS parçacık boyu dağılım raporu	73
Şekil 5.31. A-FA için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	74
Şekil 5.32. Dondurma işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut üzerindeki etki grafiği	75
Şekil 5.33. Dondurma işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut dağılımı (PDI) üzerindeki etki grafiği	76
Şekil 5.34. Dondurma işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etki grafiği	77
Şekil 5.35. Liyofilizasyon işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut üzerindeki etki grafiği.....	79
Şekil 5.36. Liyofilizasyon işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut dağılımı (PDI) üzerindeki etki grafiği	80
Şekil 5.37. Liyofilizasyon işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etki grafiği	82
Şekil 5.38. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun gastrointestinal stabilite sonuç grafiği.....	84
Şekil 5.39. Ferulik asit ve A-FA kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği.....	86

Şekil 5.40. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik)	90
Şekil 5.41. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, Tlag).....	90
Şekil 5.42. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, F0).....	90
Şekil 5.43. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik)	91
Şekil 5.44. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, Tlag).....	91
Şekil 5.45. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, Fmax).....	91
Şekil 5.46. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, Fmax ve Tlag).....	92
Şekil 5.47. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi Modeli)	92
Şekil 5.48. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, Tlag)	92
Şekil 5.49. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, F0)..	93
Şekil 5.50. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli).....	93
Şekil 5.51. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli, Tlag)	93
Şekil 5.52. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas modeli, F0).....	94

Şekil 5.53. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli)	94
Şekil 5.54. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli, Tlag).....	94
Şekil 5.55. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli)..	95
Şekil 5.56. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli, Tlag).....	95
Şekil 5.57. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli)	95
Şekil 5.58. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli, Tlag).....	96
Şekil 5.59. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli)	96
Şekil 5.60. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli, Tlag).....	96
Şekil 5.61. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli)	97
Şekil 5.62. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli, Tlag).....	97
Şekil 5.63. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 1 modeli).....	97
Şekil 5.64. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 2 modeli).....	98
Şekil 5.65. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 3 modeli).....	98
Şekil 5.66. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 4 modeli).....	98
Şekil 5.67. Ferulik asit'e ait DSC eğrisi	99

Şekil 5.68. PLGA polimerine ait DSC eğrisi.....	99
Şekil 5.69. A-Blank kodlu formülasyona ait DSC eğrisi	100
Şekil 5.70. A-FA kodlu formülasyona ait DSC eğrisi	100
Şekil 5.71. Fiziksel karışıma ait DSC eğrisi.....	101
Şekil 5.72. Ferulik asit'e ait FT-IR spektrumu	101
Şekil 5.73. PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu	102
Şekil 5.74. A-Blank kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu	102
Şekil 5.75. A-FA kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu.....	103
Şekil 5.76. Fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumu.....	103
Şekil 5.77. Ferulik asit'e ait ¹ H-NMR spektrumu	105
Şekil 5.78. PLGA polimerine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	106
Şekil 5.79. A-Blank kodlu formülasyona ait ¹ H-NMR spektrumu.....	107
Şekil 5.80. A-FA kodlu formülasyona ait ¹ H-NMR spektrumu	108
Şekil 5.81. Fiziksel karışıma ait ¹ H-NMR spektrumu	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

% EE	: Enkapsülasyon etkinliği
% RSD	: Varyasyon katsayısı
A-Blank	: Optimum blank formülasyon
ABTS●+	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal
AchE	: Asetilkolinesteraz
AD	: Alzheimer Hastalığı
A-FA	: Ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonu
AIC	: Akaike Bilgi Kriteri
ATC	: Asetilkolin iyodür
ATP	: Adenozin trifosfatın
A β	: B-amiloid
BTC	: Bütirilkolin iyodür
BuChE	: Butirilkolinesteraz
CAS	: Kimyasal özet hizmeti
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	: Diferansiyel tarama kalorimetrisi
DTNB	: 5,5' - ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
FA	: Ferulik asit
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri
GİS	: Gastointestinal sistem
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Birliği

IUPAC	: Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
LOD	: Tespit sınırı
LOQ	: Ölçüm limiti
L-PLA	: L-poli laktik asit
MSC	: Model Seçim Kriteri
MW	: Molekül ağırlığı
OS	: Oksidatif stres
PAA	: Poli (akrilik asit)
PBS	: Fosfat tamponu
PDI	: Polidispersite indeksi
PDMS	: Poli dimetil siloksan
PEG	: Poli (etilen glikol)
PEO	: Poli (etilen oksit)
PEVAc	: Polietilen vinil asetat kopolimeri
PGA	: Poli (glikolik asit)
PLA	: Poli (laktik asit)
PLGA	: Poli (d, l-laktik-ko-glikolik asit)
PNVP	: Poli (N-vinil-2-prolidon)
PVA	: Poli (vinil alkol)
PVAc	: Poli (vinil asetat)
R ²	: Korelasyon katsayısı
RES	: Retiküloendoteliyal sistem
ROS	: Reaktif oksijen türlerinin
SS	: Standart sapma
TCA	: Trikloroasetik asit
T _g	: Camsı geçiş sıcaklığı

TNF- α : Tumor nekroz faktörü-alfa
USP : Birleşik Devlet Farmakopesi

1. GİRİŞ

Nanopartiküller ilaç etkin maddelerinin salım özelliklerini değiştirerek modifiye salım sağlaması, yüksek farmakolojik etki göstermesi, istenen bölgede toplanması / hedeflendirilmesi, stabilite sorunlarının olmaması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve sterilize edilebilmesi gibi özellikleri sayesinde son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. PLGA vücutta toksik olmayan monomerlerine dönüşen medikal alanda önemli polimerlerdir. Modifiye ilaç salımı yapan sistemlerin hazırlanmasında dünya genelinde tercih edilmekte olup biyoparçalanır polimerlerden biridir. PLGA alifatik poliesterler grubuna dahil olan poli laktik asit (PLA) ve poli glikolik asit (PGA)'in farklı oranlarından oluşan bir kopolimeridir.

Ferulik asit, düşük toksisiteye sahiptir ve çok fonksiyonlu biyoaktif bir maddedir. Ferulik asit ilaç, gıda ve kozmetik gibi birçok farklı alan ve endüstride sıklıkla kullanılmaktadır. Ferulik asit, antiinflamatuvar, antialzheimer, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antihiperlipidemik ve antidiyabetik gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir.

Ferulik asit kan beyin bariyerini geçme ve yeterli konsantrasyonda merkezi sinir sistemine geçmektedir. Ferulik asit antiinflamatuvar ajan olarak hareket ederek A β -fibril oluşumunu önleyerek nöroproteksiyon uygular, serbest radikal oluşumunu ve asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChe)'in enzim aktivitesinin inhibe edilmesini sağlayarak Alzheimer tedavisinde umut verici bir molekül olmuştur.

Ferulik asit, güçlü bir antioksidandır. Oksidatif stres vücuttaki oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki dengesizliği ifade eder. Bu dengesizlik durumu oksidasyona eğilimli hale getirir ve daha sonra nötrofillerin inflamatuvar infiltrasyonuna, proteaz sekresyonunun artmasına ve çok sayıda üretilmesine yol açar. Oksidatif ara maddeleri doku dejenerasyonuna, erken yaşlanmaya, apoptoza, hücre transformasyonuna ve kansere yol açar. Ferulik asit, oksidatif serbest radikalleri temizleyerek, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek ve çoklu sinyal yollarına katılarak antioksidan etki göstermektedir.

Bu tez çalışmasında birçok farmakolojik özelliğe sahip ferulik asidin antioksidan ve antialzheimer terapötik özelliklerini, daha az etkin maddeye oranla yüksek aktivite göstermesi, daha düşük yan etkiler ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi için PLGA bazlı nanosistemlerin hazırlanması ve karakterizasyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Nanopartiküller

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde tıp ve biyoteknoloji alanında nanopartikül sistemlerinin araştırma ve uygulamaları önemli ölçüde arttığı görülmektedir (Derman vd., 2013).

Nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında, aktif ve pasif ilaç hedeflemesine ulaşmayı sağlamak için partikül boyutu ve yüzey özellikleri kolayca değiştirilebilir.(Nagavarma vd., 2012).

Eczacılık alanında, ilk çalışmalar antikanser ilaçlar ve aşılar kullanılarak yapılmıştır. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması, partikül boyutu ve yüzey özelliklerinin kolayca modifiye edilebilmesi, ilacın uzun süreli ve kontrol edilmiş salımı, terapötik etkinliğin artırılması, yan etkilerin azaltılması ve çözünmeyen etken maddelerin aynı taşıyıcıda verilebilmesi gibi avantajlar sunar. Bu da stabiliteyi artırır ve hasta uyumunu geliştirir.(Sayiner ve Çomoğlu, 2016; Öztürk ve Kıyan, 2020a).

2.1.1. Polimerik nanopartiküller

10-1000 nm arasında boyuta sahip olan polimerik nanopartiküller, tercihen 10-100 nm boyutunda biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilen polimerlerden hazırlanan yapılardır. Bu nanopartiküller, ilacın çözündüğü, hapsedildiği, kapsüllendiği veya bir nanopartikül matrisine eklenerek oluşturulurlar (Nagavarma vd., 2012; Öztürk vd., 2019a; Sahil vd., 2011). Nanoküre veya nanokapsül olarak da adlandırılabilirler, bu isimlendirme hazırlanma yöntemlerine ve etkin maddenin bulunduğu yere bağlıdır (Derman vd., 2013).

Nanoküreler, ilaç etkin maddesinin polimerik matriste dağıtıldığı, çözündüğü ya da adsorbe edildiği sistemleri ifade ederken, nanokapsüller polimerik bir zar /membran ile kaplanmış çekirdek içinde ilaç etkin maddesini taşıyan sistemleri ifade eder (Sengel Turk, 2009).

2.1.1.1. Polimerik nanopartiküllerin avantajları

Polimerik nanaopartiküllerin birçok avantajı vardır. Bu avantajlardan birkaçı şu şekilde sıralanabilir; Polimerik nanopartiküller, etkin madde enkapsülasyon oranının yüksek olması nedeniyle ilaç etkin maddesini hücre içi dağılımını kolaylaştırır ve artırır.

Ayrıca, polimerik partiküller etkin maddeleri katı matris içinde koruyarak bozunmasını engeller ve nanopartiküllerin yüzey özelliklerini modifiye ederek retiküloendotelyal sistemin (RES) makrofajları tarafından tanınmasını önler. Bu özellikler sayesinde, polimerik nanopartiküller etkin maddenin hedef bölgeye ulaşabilirliğini artırır.

Polimerik nanopartiküllerin fizyolojik doku ve hücreler iyi penetre olduğu bilinmektedir. Küçük boyutları, dar kapillerlerden geçmelerine ve tümöral hücrelere ulaşmalarına olanak sağlar. Bunun yanı sıra, polimerik nanopartiküllerin küçük hacmi, fagositlerden kaçabilmelerini ve dolaşımında daha uzun süre kalışlarını sağlar (Müderrişoğlu, 2010; Tüylek, 2019).

Polimerik nanopartiküller, ilaç moleküllerinin modifiye ve kontrollü salınımını gerçekleştirir ve kararlılığını artırır. Bu partiküller, genler, proteinler, polinükleotitler, aşılardan gibi çeşitli molekülleri taşıyabilir. Üretimleri kolay ve maliyetleri düşüktür, bu da nihai ürün fiyatını düşürür. Polimerik nanopartiküllerin etkin maddenin hedef bölgede kontrollü bir şekilde salınımını sağlaması, sistemik toksisitenin azalmasına yardımcı olur. Ayrıca, ani kan düzeyi yükselmelerini engeller ve etkin maddenin yan etkilerini azaltırken etkinliğini artırır (Athar ve Das, 2014; Derman vd., 2013; Emrah, 2014).

2.1.2. Polimerik nanopartiküllerde kullanılan polimerler

Polimerik nanopartiküllerin üretimi için doğal veya sentetik polimerler tercih edilir. Doğal polimerler arasında albumin, jelatin, aljinat ve kitosin gibi maddeler yaygın olarak kullanılırken, sentetik polimerler arasında poliakrilat, polikaprolakton, polilaktik asit ve poliglaktolik asit gibi maddeler bulunur (Sayiner ve Çomoglu, 2016).

Polimerlerin kullanımı için belirli özellikler aranır. Polimerlerin toksik olmaması, antijenik olmaması, vücut tarafından kabul edilebilir olması, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve biyoyumlu olması önemlidir (Nagavarma vd., 2012).

Ayrıca, polimerlerin vücutta parçalanabilmesi de önemli bir faktördür. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler suda çözünmezler, ancak vücut sıvılarında hidrolize olur ve enzimler tarafından parçalanırlar. Vücutta parçalanmayan polimerler ise hidrofilik veya hidrofobik özelliklere sahiptir. Hidrofilik polimerler hidrojel olarak adlandırılır ve çapraz bağlanma derecesine bağlı olarak şişme özelliği gösterirken, hidrofobik polimerler suda çözünmez ve şişme yapmazlar (Müderrişoğlu, 2010; Rao ve Kamala, 2020). İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimer örnekleri Tablo 2.1.'de yer verilmiştir.

Tablo 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler (Müderrişoğlu., 2010)

Polimer kaynağı	Vücutta parçalanabilir	Vücutta parçalanmaz
Doğal kaynaklı	Kitosan Albümin Aljinat Jelatin	
Sentetik kaynaklı	Poli (laktik asit) (PLGA) Poli (glikolik asit) (PGA) Polikaprolakton Poli(alkil-siyanoakrilat) (PACA) Poli(ostoester) Poli(anhidrit) Poli(aminoasitler)	<i>Hidrofil:</i> Poli (hidroksi etil metakrilat) Poli (metil metakrilat) Poli (N-vinil-2-prolidon) (PNVP) Poli (vinil alkol) (PVA) Poli (akrilik asit) (PAA) Poli (vinil asetat) (PVAc) Poli (metakrilik asit) Poli (etilen aksit) (PEO) Poli (etilen glikol) (PEG) <i>Hidrofob:</i> Polietilen vinil asetat kopolimeri (PEVAc) Silikonlar Poli dimetil siloksan (PDMS)

2.1.3. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması

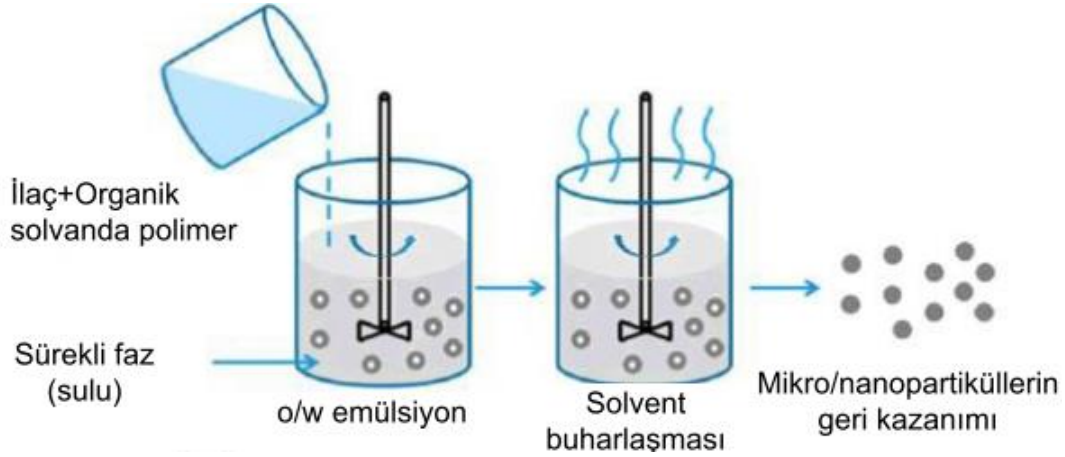
Çeşitli doğal ve sentetik polimer nanopartiküllerin üretimi için uygun bir üretim süreci, polimer seçimi ve aktif bileşenin fizikokimyasal özelliklerine göre bir yöntem seçilmelidir (Müderrişoğlu., 2010).

Nanopartiküllerin belirli uygulamaları ve özellikleri için farklı sentez mekanizmaları geliştirilmiştir.

2.1.3.1. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi

Literatür incelendiğinde emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin nanopartikül hazırlanmasında ilk denenen yöntem olduğu anlaşılmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011). Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi başlıca iki ana adımdan oluşur. İlk olarak polimer organik bir çözücü içinde çözünür ve bu hazırlanan çözelti, su fazıyla emülsifiye edilir. Eski zamanlarda kloroform ve diklorometan gibi çözücüler tercih edilse

de, şu anda daha düşük toksisiteye sahip olan etil asetat kullanılmaktadır (Müderrişoğlu,, 2010; Nagavarma vd., 2012). İkinci adımda, solvent buharlaşarak polimerin emülsiyon sürekli fazına yayılır ve nanoparçacıklar oluşturur. Oluşan nanoparçacıklar, santrifüjleme ile ayrıştırılır, safsızlıklardan arındırmak için distile suyla yıkanır ve son olarak liyofilizasyon işlemine tabi tutularak depolanır (Nagavarma vd., 2012; Pal vd., 2011). Şekil 2.1.'de emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi sunulmuştur.

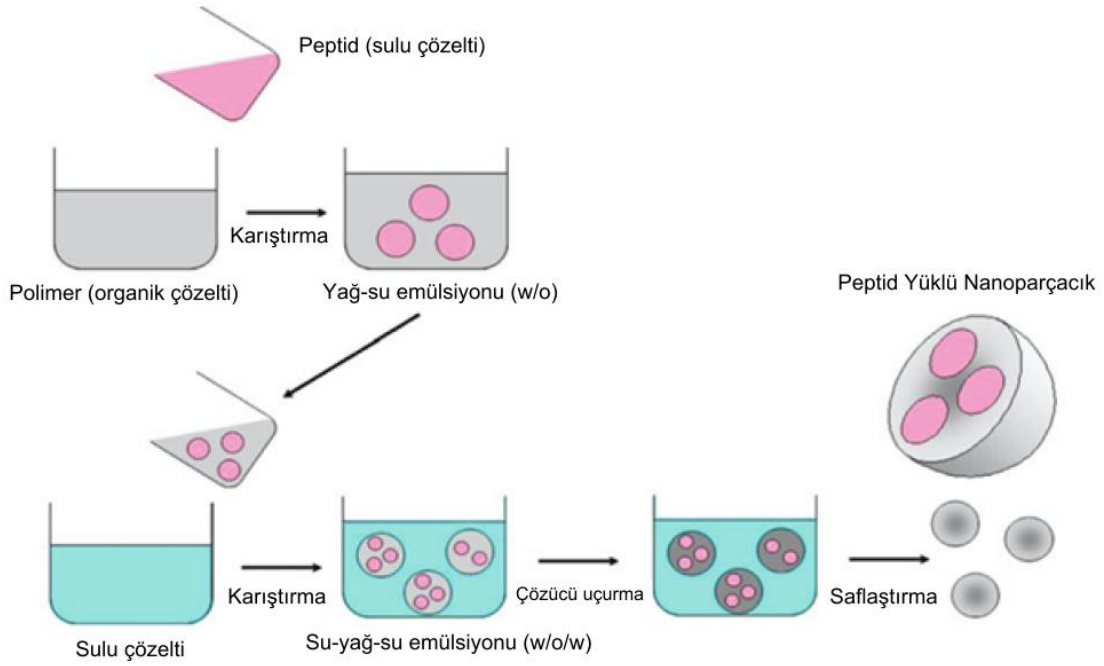


Şekil 2.1. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (Nagavarma vd., 2012)

2.1.3.2. Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi

Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi, sudaki çözünürlüğü yüksek ilaç etkin maddeleri için uygun olmaması nedeniyle çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin geliştirilmesine bir neden teşkil etmiştir. Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle sudaki çözünürlüğü yüksek hidrofilik ilaç etkin maddelerin enkapsülasyonu yapılabilmektedir (Müderrişoğlu,, 2010).

Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin ana unsurlarında biri yüksek hızlı karıştırma. Etkin madde içeren sulu fazın organik çözücü ile hazırlana polimer çözeltisine eklenmesi ile su/yağ emülsiyonu oluşur. Su/yağ emülsiyonu yüksek hızla karıştırılarak ikinci bir su fazıyla birleştirilir. Su/yağ/su çoklu emülsiyonu oluşturulur. Oluşan çoklu emülsiyondan oda ısısı ya da vakum altında çözücünün uzaklaştırılmasıyla partiküller çöktürülür. Santrifüj ve yıkama proseslerinden sonra nanopartiküller toplanır, ardından liyofilize edilir (Derman vd., 2013; Müderrişoğlu,, 2010; O'Donnell ve McGinity, 1997). Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül üretimine Şekil 2.2.'de yer verilmiştir.



Şekil 2.2. Çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (Derman vd., 2013)

2.1.3.3. Emülsiyon çözücü difüzyon yöntemi

Emülsiyon çözücü difüzyonu, nanopartikül oluşumunda sıkça başvurulan bir tekniktir ve bu, solvent buharlaştırma yönteminin geliştirilmesi ile elde edilmiştir. Bu süreçte, kapsülleyici polimer, su ile karışabilen bir çözücüde (propilen karbonat, benzil alkol, vb.) parçalanır ve su ile doymun hale getirilir. Daha sonra polimer-su-doymun solvent fazı, bir stabilizatör içeren su bazlı bir çözeltiye emülsifiye edilir. Solvent, yağ-polimer oranına bağlı olarak, nanosferler ve nanopartikülleri oluşturup dış faza dağılır. Son aşamada, buharlaştırma veya süzme yoluyla, kaynama noktasına bağlı olarak solvent giderilir. Bu teknik, yüksek kapsülleme verimliliği, homojenleştirme ihtiyacının olmaması, yüksek tekrarlanabilirlik, ölçeklenebilirlik, kolaylıkla üretilebilir olması ve dar boyut dağılımı gibi çeşitli avantajlar sunar.(Pal vd., 2011; Pinto Reis vd., 2006).

2.1.3.4. Tuzla çöktürme yöntemi

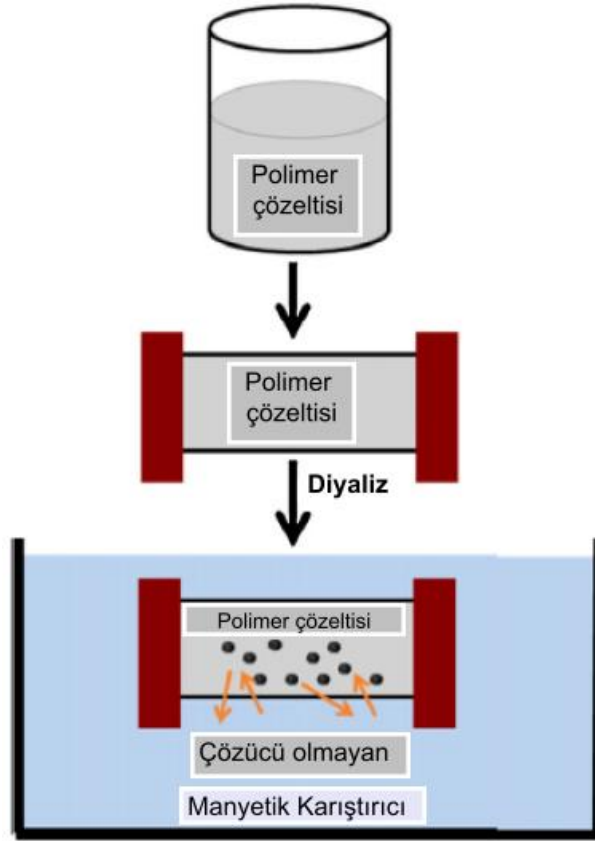
Tuzla çöktürme yöntemi, su ile karışabilen çözücülerin sulu çözeltilerden tuzlanma yoluyla ayrılmasını temel alır. Bu metod, su ile karışabilen çözücülerin sulu çözeltilerden tuzlanma yoluyla ayrılmasını temel alır. İşlem, tuz ajanları (elektrolitler örneğin magnezyum klorür veya kalsiyum klorür, elektrolit olmayan maddeler örneğin sükröz) ve kolloidal stabilizatörler (polivinil piroolidon veya hidroksi etil selüloz gibi) içeren sulu

jellerde gerçekleşir. Bu durumda ilaç etkin maddesi ve polimer aseton ve benzeri bir çözücü içinde emülsiyon haline getirilirler. Yeterli miktarda su veya sulu bir çözelti ile bu yağ/su emülsiyonunun seyreltilmesi, emülsiyon damlacıklarında çözünmüş polimerin çökmesini ve nanokürelerin oluşumunu tetikler, çünkü bu işlem asetonun sulu faza difüzyonunu artırır. İşlem sonunda, çözücüler ve tuz giderici maddeler çapraz akışlı filtrasyonla çıkarılır (Müderrisoğlu, 2010).

Tuzla çökeltme yöntemi, yüksek sıcaklık gerektirmeden etkili bir şekilde işler, bu sebeple bu teknik, ısı hassasiyeti olan aktif bileşenler veya yardımcı maddeler üzerinde çalışırken tercih edilebilir. Ancak bu yöntemin zorlukları arasında nanopartiküllerin karmaşık bir yıkama işlemi ve genellikle yüksek kullanım maliyeti bulunmaktadır (Müderrisoğlu, 2010; Pal vd., 2011; Pinto Reis vd., 2006).

2.1.3.5. Diyaliz

Diyaliz, polimerik nanopartiküllerin dar ve düzgün dağılımıyla üretilmesi için sade ve etkin bir metod olabilmektedir. Bu süreçte, polimerler organik çözücülerde çözünür ve moleküler ağırlıklarına bağlı olarak diyaliz tüplerine yerleştirilir. Temelde, bu süreç, membran üzerinde çözücü değişimini takiben tek biçimli bir nanopartikül süspansiyonunun oluşmasına ve polimerin düşük çözünürlüğü sonucunda toplanmasına dayanır. Diyaliz metodunun çalışma mekanizması tamamen aydınlatılmamış olsa da, nanoçöktürme yöntemi ile benzer bir mekanizmaya sahiptir (Derman vd., 2013; Rao ve Geckeler, 2011). Diyaliz yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi Şekil 2.3.'te sunulmuştur.



Şekil 2.3: *Diyaliz yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi* (Derman vd., 2013)

Diyaliz süreçleri, polimer solüsyonlardan çözücülerin pasif transferini sağlamak için diyaliz membranlarının fiziksel engeller olarak kullanılmasına dayanmaktadır (Derman vd., 2013; Müderrisoğlu, 2010; Rao ve Geckeler, 2011).

2.1.3.6. Faz ayrımı – koaservasyon yöntemi

Koaservasyon işlemi, sıcaklık değişikliklerinin, anti-çözücülerin veya tuzların eklenmesi veya polimerler arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olarak gerçekleşebilir. Bu aşamada, polimerlerin organik fazda çözünürlüğünün azaltılması, polimer bakımından zengin fazların, yani koaservatların oluşumunu tetikler. Bu prosedürde, aktif bileşen bir polimer solüsyonunda dağıtılır ve bir koaservat tarafından sarılır. Hidrofilik ilaçlar, proteinler ve peptidler gibi, su içinde çözülür ve polimer solüsyonlarına dağıtılırken, steroidler gibi hidrofobik ilaçlar polimer çözeltilerinde çözünür veya dağıtılır (Müderrisoğlu, 2010; Sahil vd., 2011).

2.1.3.7. Süperkritik akışkan teknolojisi

Bir sıvının süperkritik hale gelmesi, belirli bir sıcaklığı ve basıncı aştığında, sıvı ve gaz fazları arasındaki belirgin ayrımı kaybeder ve faz değişikliği göstermez. CO₂, toksik olmayan, yanıcı olmayan, ekonomik ve süperkritik durumlar için ideal özelliklere (T= 31.1°C, P= 73.8 bar) sahip olması sebebiyle en sık kullanılan süperkritik sıvıdır (Chakravarty vd., 2019; Derman vd., 2013).

Süperkritik sıvılar, çevre dostu çözücüler olarak işlev görürler ve yüksek kaliteli partikül oluşumuna izin vererek kendilerini geleneksel yöntemlere karşı cazip bir seçenek haline getirirler. Mikro ve nanopartikül oluşumu için genellikle iki ana teknik kullanılır. İlki, Süperkritik Çözeltilerin Hızlı Genişletilmesi (RESS) adı verilen yöntemdir, bu teknikte bir madde süperkritik sıvıda çözülür ve bir çözelti oluşturur. İkinci teknik, RESOLV olarak bilinen ve RESS'in bir varyasyonu olan süperkritik çözeltilerin sıvı çözücüye hızlı genişlemesidir. Bu yöntemde, genişleme süperkritik çözeltiyi atmosfer hava yerine sıvı bir çözücüye dönüştürür. Bu basit uyarlamayla, RESS yöntemi önemli ölçüde değiştirilmiş olur (Müderrişoğlu, 2010; Nagavarma vd., 2012).

2.1.3.8. Nanoçöktürme yöntemi

İlaç içeren polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için en basit yöntem Fessi ve diğerleri tarafından geliştirilen nanoçöktürme yöntemidir (Salatin vd., 2017). Nanoçöktürme yöntemi, polimerik nanopartiküllerin ilaç ile yüklenebilmesi için en sade ve yaygın kullanılan prosedürlerden biridir. Bu teknik, çözücü yer değiştirme prensibine dayanır ve iki çözücünün - biri organik (örneğin aseton veya asetonitril) ve diğeri su - karışabilir olmasını gerektirir (Salatin vd., 2017; Zielinska, 2020).

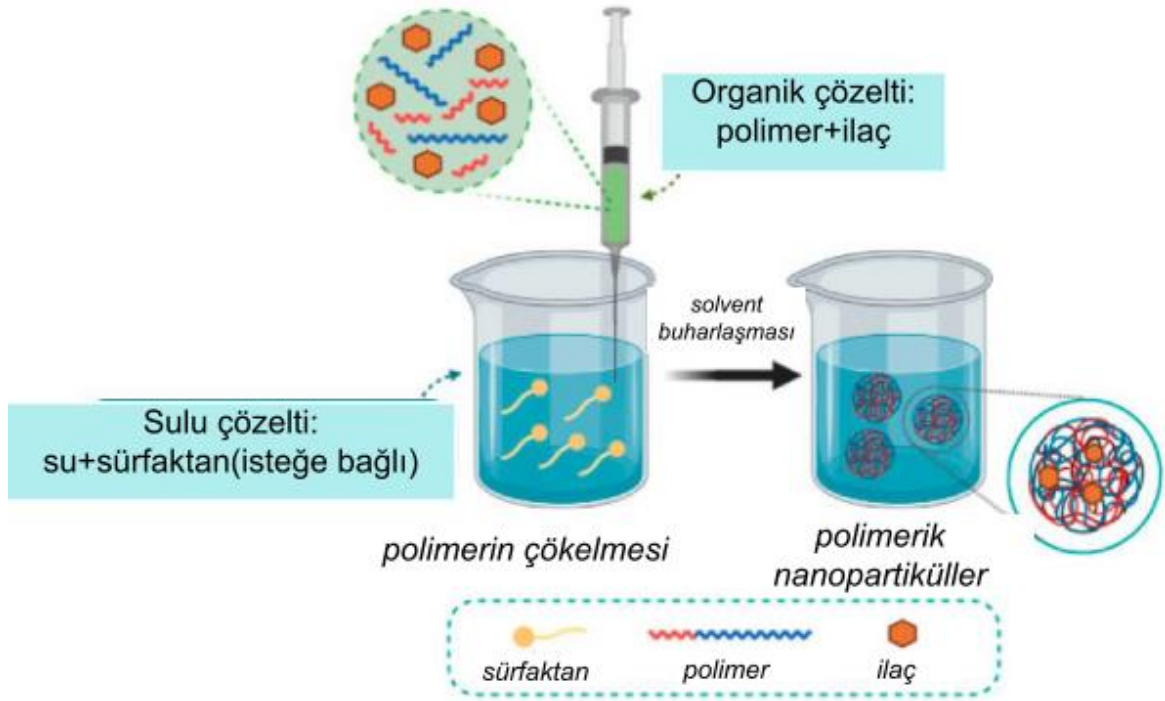
Bu prosesin temelinde, lipofilik çözeltilerden organik çözücünün sulu faza geçişi esnasında polimerlerin çökmesi ve arayüzey oluşturması bulunur. (Zielinska, 2020). Bu aşamada, polimer aseton içerisinde çözülür ve ardından ilaç eklenerek çözülmesi sağlanır. Bu karışım, stabilizatör içeren distile suya damlatılır ve manyetik bir karıştırıcı ile homojen hale getirilir. Son adımda, aseton ve fazla su vakum kullanılarak giderilir (Bairagi vd., 2018; W. Li D. vd., 2021; Liu vd., 2020a; Muthu, 2009).

Nanoçöktürme yöntemi nanopartiküllerin üretilmesi için çok basit ve hızlı bir yöntem olmasının yanında ilaç yükleme ve kapsülleme verimi de yüksektir. Ayrıca nanoçöktürme ile çok hidrofilik, nispeten çok hidrofobik ilaçlar da dahil olmak üzere

çeşitli polimer ve ilaçlardan yüksek ilaç yüklü kararlı nanopartikül üretmek için uyarlanabilir (Liu vd., 2020a; Liu vd., 2020b).

Polimer sistemleri, amfifilite ve nötr yük özelliklerine sahip olmasalar bile, nanoçöktürme yöntemi ile nanopartiküllere dönüştürülebilir. Biyouyumlu nanotaşıyıcı malzemeler olarak uygulama bulan PLA, PGA ve PLGA, bu durumun en bilindik örneklerindedir (Schubert vd., 2011).

Nanoçöktürme sürecinde, çözücü seçimi kritik bir öneme sahiptir. Çözücü seçimi, üretilen nanopartikülün boyutunu ve kapsülleme verimliliğini belirleyen önemli bir faktördür. Düşük toksisitesi ve su ile karışabilir olmasının yanı sıra, düşük kaynama noktası nedeniyle aseton, çözücü olarak sıklıkla tercih edilir (Almoustafa vd., 2017). Nanoçöktürme yöntemi şematik gösterimi Şekil 2.4.'te sunulmuştur.



Nanoçöktürme yönteminin avantajları aşağıda sıralanmıştır.

- ✓ Nanopartiküllerin oluşum sürecinde ek enerjiye ihtiyaç duyulmaz,
- ✓ Düşük enerjiyle etkin şekilde çalışma imkânı sağlar,
- ✓ Bu metodun uygulanması için karmaşık bir donanıma ihtiyaç yoktur,
- ✓ Yüzey özelliklerini etkileyecek veya toksik etkilere neden olabilecek herhangi bir yüzey aktif madde ihtiyaç duyulmaz,

- ✓ Düşük maliyetli ve kolay prosedüre sahip bir yöntem olması (Müderrişoğlu, 2010; Schubert vd., 2011).

2.1.4. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

Polimerik nanopartiküller, boyutları, şekilleri, yüzey özellikleri, kristallilik durumları ve bileşimleri ve yoğunlukları gibi fiziksel özellikler bakımından çeşitlilik gösterirler. Nanopartikül karakterizasyonunda, boyut genellikle en kritik parametre olarak kabul edilir. Nanopartiküllerin özellikleri genellikle nanopartiküllerin kapsamlı bir karakterizasyonunu hedefleyen çeşitli teknikler aracılığıyla incelenir (Mourdikoudis vd., 2018; Zielinska, 2020).

2.1.4.1. Parçacık boyutu ve dağılımı

Nanopartikül aracılı ilaç salım sistemi çalışmaları ilerledikçe nanopartiküllerin biyolojik ortamla etkileşimlerini yöneten parametreleri anlamak daha da önemli bir hal almaktadır. Bu parametrelerin çalışmasından tanımlanan ilkeler, yeni nanopartikülleri tasarlamak, benzersiz işlevsellikler vermek ve nanopartikül formülasyonları geliştirmek için kullanılır. Tasarım parametrelerinin temellerinden biri de nanopartiküllerin boyutudur (Hickey vd., 2015).

Farklı tekniklerle üretilen nanopartiküller genellikle ortalama 100-300 nm çapında olma eğilimindedir. Polidispersite indeksi ya da bir diğer değişle parçacık boyutu dağılımı varyansının olabildiğince düşük (idealen sıfıra yakın) ve boyut dağılımının tek modlu / monodispers olması arzu edilir (Zielinska, 2020).

2.1.4.2. Zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli, koloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyeli ifade etmek için bilimsel bir terimdir. Bu terim, dağıtıcı ortam ile dağılmış partiküller arasında yapışan sabit bir sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkını ifade eder. Zeta potansiyeli, koloidal dispersiyonların stabilitesini belirleyen önemli bir gösterge olarak kabul edilir (Honary ve Zahir, 2013).

Tipik olarak + / - 20-30 mV'nin üzerindeki zeta potansiyeli değerleri, koloidal olarak kararlı kabul edilir (Mourdikoudis vd., 2018).

Zeta potansiyeli ölçümleri, ilaç-nanopartikül etkileşim mekanizmasını aydınlatmada yardımcı olabilir (Zielinska, 2020).

2.1.4.3. In vitro dissolüsyon

Nanopartikül sistemleri, çeşitli hastalıkların tedavisinde umut vaat ederken, beklenmedik ürün kalitesi veya performansındaki değişiklikler etkinliğin azalmasına, değişikliklere ve hatta toksisite sorunlarına yol açabilir. Nanoteknoloji destekli ürünlerin hızla artması ve ilaç geliştirme sürecinin hızlanmasıyla birlikte, bu yeni ilaç salım sistemlerinin performansını ve kalitesini sağlamak için standartlaştırılmış test yöntemlerine ihtiyaç vardır. *In vitro* dissolüsyon testi, ilaç salım sistemlerinin *in vivo* performansının kontrolünde ve tahmininde önemli bir rol oynar. Nanopartikül sistemleri için standart bir farmakope bulunmamasına rağmen, Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) 1970 yılında resmi olarak *in vitro* çözünme testini kabul etmiştir (Kroll vd., 2009; Shen ve Burgess, 2013).

Ürün performansını sağlamak ve ürün geliştirmeye yardımcı olmak amacıyla, nanopartikül ilaç salım sistemleri için uygun *in vitro* dissolüsyon testi yöntemleri geliştirmek için çalışılmıştır. Bu yöntemler genel olarak üç kategoriye ayrılabilir:

1. Membran difüzyon yöntemleri / diyaliz yöntemi
2. Numune alma ve ayırma yöntemleri
3. Sürekli akış yöntemleri (Bhardwaj ve Burgess, 2010).

2.1.4.3.1. Membran difüzyon yöntemi

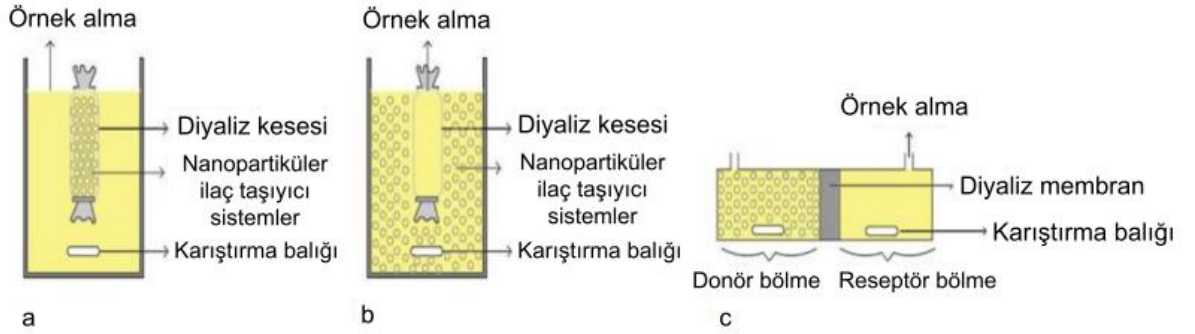
Membran difüzyon yöntemleri, nanopartikül sistemlerin *in vitro* çözünme testi için en yaygın kullanılan yöntemler arasındadır. Bu yöntemde, nanopartikül sistemi serbest ilaçların geçebildiği bir membran üzerine yerleştirilir, ancak salım ortamından uyumsuz bir diyaliz membranı ile ayrılır.

Membran difüzyonu veya diyaliz yöntemleri, üç farklı gruba ayrılabilir. Bunlar şunlardır:

- Diyaliz kesesi yöntemi
- Ters diyaliz kesesi difüzyonu yöntemi
- Yan yana diyaliz yöntemidir.

Diyaliz kesesi yönteminde, nanopartikül sistemler diyaliz kesesi içerisine yerleştirilir sisteme konular ve su banyosunda karıştırılarak sistem kurulur (Çobanoğlu

ve Şenel, 2023; Shen ve Burgess, 2013). Farklı diyaliz yöntemleri şematik olarak Şekil 2.5.'te sunulmuştur.



Şekil 2.5. Farklı diyaliz yöntemleri. a. Diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi b. Ters diyaliz kesesi yöntemi şematik gösterimi c. Yan yana diyaliz kesesi yönteminin şematik gösterimi (Çobanoğlu ve Şenel, 2023; Shen ve Burgess, 2013)

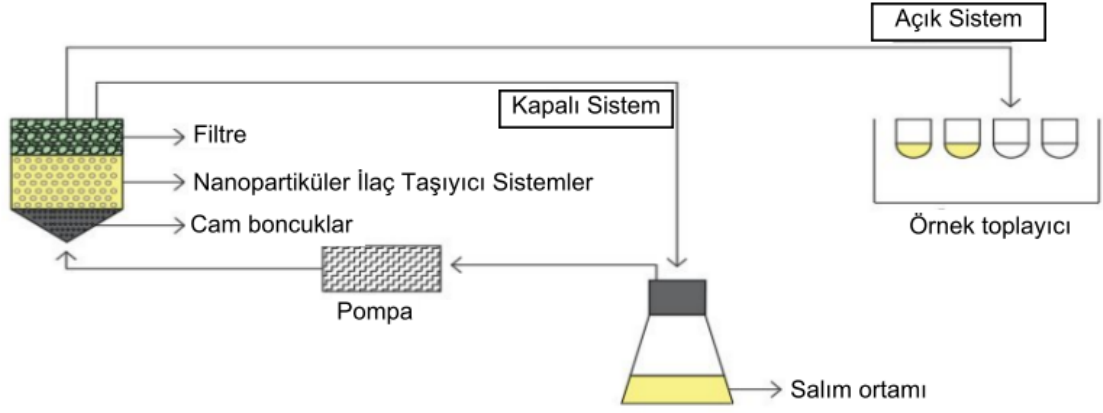
2.1.4.3.2. Numune alma ve ayırma yöntemi

Numune alma ve ayırma yöntemleri, özellikle polimer parçacık sistemleri için *in vitro* salım testlerinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler, kullanım kolaylığı nedeniyle tercih edilir. İlaç yüklü nanopartiküller doğrudan salım ortamına eklenir ve sabit bir sıcaklıkta tutulur. İlaç yüklü nanopartikülleri, farklı zaman aralıklarında ultrafiltrasyon, ultrasonik ve santrifüjleme ve santrifüjlü ultrafiltrasyon gibi numune ayırma yöntemleri ile ayrılabilir ve analiz edilebilir (Amatya vd., 2013; Çobanoğlu ve Şenel, 2023; Shen ve Burgess, 2013).

2.1.4.3.3. Sürekli akış yöntemi

Sürekli akış yöntemi (USP Aparat/Cihaz 4), bir akış hücresi kullanarak nanopartikül sistemini küçük bir hücreye yerleştirerek ve salım ortamını hücre boyunca pompalayarak gerçekleştirilen bir ilaç salım testi yöntemidir. Bu yöntemde bir pompa ve ara rezervuar kullanılır. Akış hücresindeki filtreden geçen salınan ilaç, çevrimdışı ve çevrimiçi olarak izlenir. Makropartiküller akış hücresindeki bir filtre ile ayrıştırılır ve salınan aktif madde istenilen sıklıkta örneklenebilir. Sürekli akış yöntemleri, immobilize edilmiş nanopartiküller üzerine sürekli olarak çözücü akıtılarak, parçacıkları hidratlayarak ve ilacın çözünmesini ve difüzyonunu indükleyerek *in vivo* ortamı taklit etmeye çalışır. Akış kısıtlayıcı hücre, deri altı dokuya yapılan enjeksiyon bölgesini taklit eder ve mikropartiküllerin etrafında sürekli dolaşan bir ortam, dinamik *in vivo* ortamını simüle

eder (Kim vd., 2021; Shen ve Burgess, 2013). Sürekli akış yönteminin, kapalı ve açık sistem olarak şematik gösterimi Şekil 2.6.'da sunulmuştur.



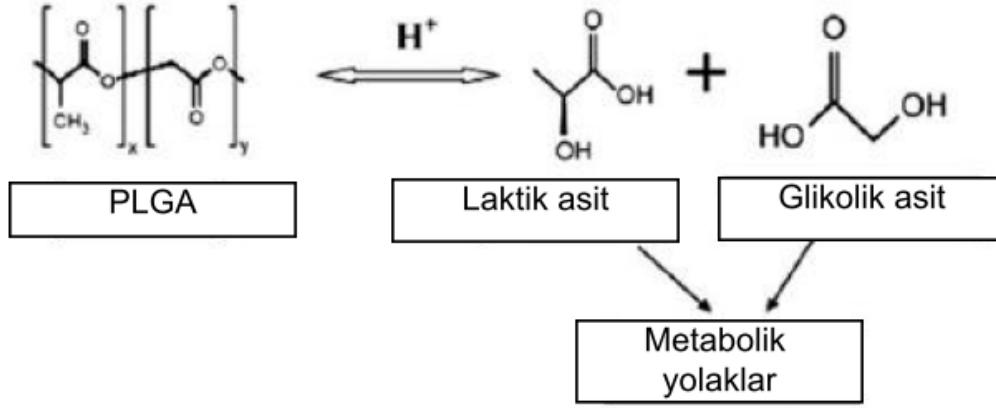
Şekil 2.6. Sürekli akış yönteminin, kapalı ve açık sistem olarak şematik gösterimi (Çobanoğlu ve Şenel, 2023)

2.2. PLGA

Nanoöktürme yöntemi, farklı polimerler için geliştirilmiştir, ancak şu ana kadar PLA, PLGA ve PCL gibi polimerler özellikle ilaç dağıtım sistemleri için endüstriyel uygulamalarda ve araştırmalarda kullanılmıştır (Schubert vd., 2011).

PLGA [poli(D,L-laktit-ko-glikolit)], mükemmel biyouyumluluk, fiziksel güç ve biyobozunurluk özellikleri nedeniyle ilaçlar, proteinler, DNA, RNA ve peptitler gibi nanopartiküller için bir matris olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. FDA (Amerikan Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanan poliester grupları arasında en iyi bilinenidir ve diğer birçok makromolekül taşıyıcısı olarak kapsamlı şekilde araştırılmıştır (Makadia ve Siegel, 2011; Müderrisoğlu, 2010; Öztürk vd., 2019b).

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), vücutta hidroliz yoluyla biyobozunur metabolit monomerler olan laktik asit ve glikolik asit üreten biyolojik olarak parçalanabilir bir malzeme olarak nanosistem tasarımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. PLGA, bu monomerlerin her ikisinin de vücutta endojen olduğu ve vücutta Krebs döngüsü aracılığıyla kolayca metabolize edildiği için ilaç teslimatı veya biyomalzeme uygulamalarıyla ilişkili sistemik toksisiteyi en aza indirir (Danhier vd., 2012; Kumari A. vd., 2010). PLGA'nın hidrolizi Şekil 2.7.'de sunulmuştur.



Şekil 2.7. PLGA'nın hidrolizi (Danhier vd., 2012)

2.2.1. Resomer® RG 503 H'nin özellikleri

Kontrollü salım yapmak için biyobozunur özelliğe sahip Resomer® in çok farklı çeşitleri vardır. Bu çeşitler molekülün ağırlığına, asit ve ester uç grup kimyasal bulundurmalarına, Poli (D,L-laktid) ve Poli (D,L-laktid-ko-glikolit) polimerine sahip olmalarına göre farklılık göstermektedir ([https-1](#); Varela-Fernández vd., 2022).

İsmlendirilmelerinde Poli(D,L-laktid) buluduran grup “R”, Poli(D,L-laktid-ko-glikolit) bulunduran grup “RG” kısaltmasını alır. Son grubunda ester bulunduğu “S”, asit bulunduğu “H” kısaltmasını alır. Monomerlerin birleşim oranına göre veya molekül ağırlığına göre de bir sayı alır ([https-1](#)).

Resomer® R, kontrollü salım için PLA \ Poli (D,L-laktid) bazlı, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden oluşan türüdür. Resomer® R özellikle mikropartiküller ve ilaç yüklü implantlar için tasarlanmıştır. Yapılarında asit veya ester uç grup bulundurmalarına, molekül ağırlıklarına ve doğal viskozitelrine göre farklılık göstermektedir ([https-1](#)). Resomer® R polimer çeşitleri Tablo 2.2.'de sunulmuştur.

Tablo 2.2. *Resomor® R polimer çeşitleri (https-1)*

Polimerin Adı	Doğal viskozite (dl/g)	Kompozisyon	Son grup
Resomor® R 202 H	0.16-0.24	Poli (D, L-laktit)	Asit
Resomor® R 202 S	0.16-0.24	Poli (D, L-laktit)	Ester
Resomor® R 203 H	0.25-0.35	Poli (D, L-laktit)	Asit
Resomor® R 203 S	0.25-0.35	Poli (D, L-laktit)	Ester
Resomor® R 205 S	0.55-0.75	Poli (D, L-laktit)	Ester

Resomer® RG, kontrollü salm için PLA\poli(D,L-laktid-ko-glikolit) bazlı biyolojik olarak emilebilir ekspiyanlardan oluşan türüdür. Karmaşık parenteral ilaç ürünüyle kullanılmak üzere tasarlanmıştır ve asit veya ester uçlarına göre çeşitlilik göstermektedir (https-1). Resomor® RG polimer çeşitleri Tablo 2.3.'te sunulmuştur.

Tablo 2.3. *Resomor® RG polimer çeşitleri (https-1)*

Polimerin Adı	Doğal viskozite (dl/g)	Kompozisyon	Son grup
Resomor® RG 501 H	0.08 – 0.16	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Asit
Resomor® RG 502	0.16 – 0.24	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Ester
Resomor® RG 502 H	0.16 – 0.24	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Asit
Resomor® RG 503	0.32 – 0.44	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Ester
Resomor® RG 503 H	0.32 – 0.44	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Asit
Resomor® RG 504	0.45 – 0.60	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Ester
Resomor® RG 504 H	0.45 – 0.60	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Asit
Resomor® RG 505	0.61 – 0.74	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 50:50	Ester
Resomor® RG 653 H	0.32 – 0.44	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 65:35	Asit
Resomor® RG 750 S	0.8 – 1.2	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Ester
Resomor® RG 752 H	0.14 – 0.22	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Asit
Resomor® RG 752 S	0.16 – 0.24	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Ester
Resomor® RG 753 H	0.32 – 0.44	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Asit
Resomor® RG 753 S	0.32 – 0.44	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Ester
Resomor® RG 755 H	0.50 – 0.70	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Ester
Resomor® RG 756 S	0.71 – 1.0	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Ester
Resomor® RG 757 S	0.9 – 1.3	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 75:25	Ester
Resomor® RG 858 S	1.3 – 1.7	Poli (D, L-laktid-ko-glikolid) 85:15	Ester

PLGA biyolojik olarak parçalanabilmektedir. Bu bozunma süreci seçilen polimerin molekül ağırlığına, polimer uç grubuna, laktit/glikolit oranına bağlıdır (Wischke ve Schwendeman, 2008).

Varela-Fernandez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada esterleşmiş karboksil uç grupları ile karakterize olan Resomer® 502 ve 503 ile hazırlanan ve serbest karboksil uç grupları gösteren Resomer® 502 H ve 503H ile yaptıkları çalışma ile karboksil uç gruplarının etkisini araştırmışlardır (Varela-Fernández vd., 2022).

2.2.2. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması

Nanopartikül üretimi için çeşitli yöntemler mevcuttur ve oluşum süreci, kullanılan yönteme bağlı olarak farklılık gösterebilir. PLGA nanopartiküllerinin üretimi için en yaygın kullanılan teknik, nanoçöktürme yöntemidir. Bu yöntemde, polimer ve ilaç organik bir çözücü içinde (örneğin, aseton) çözünür ve bu çözelti sulu çözeltiye damlatılır. Organik çözücü buharlaştırılır ve ardından santrifüjleme işleminden sonra elde edilen partiküller toplanır (Danhier vd., 2012; Hans ve Lowman, 2002).

2.2.3. PLGA fizikokimyasal özellikleri

L-poli laktik asit (L-PLA) ve poli glikolik asitten (PGA) hareketle hazırlanan PLGA kristalin kopolimerlerken; D, L-PLA ve PGA'dan hazırlananlar amorf yapıdadır. %70' den fazla glikolik asit içeren PLGA'ların amorf yapıda olduğu bulunmuştur. Polimerlerin kristallik derecesi ve erime noktası doğrudan polimerin molekül ağırlığı ile ilgilidir. Molekül ağırlığı gibi fiziksel özellikler, polimerin ilaç salım sistemi olarak formüle edebilme kabiliyetini etkiler (Li S. ve McCarthy, 1999).

PLGA polimerlerinin mekanik dayanımı, şişme davranışı, hidrolitik kapasitesi ve biyolojik bozunma hızı, polimerin kristalliği tarafından doğrudan etkilenir. PLGA kopolimerlerinde elde edilen kristallilik derecesi, kopolimer zinciri içindeki laktik asit ve glikolik asit gibi monomer bileşenlerinin doğasına ve molar oranlarına bağlıdır. Örneğin, %50 laktik asit ve % 50 glikolik asit içeren PLGA polimerleri, daha yüksek oranlarda her iki monomeri içerenlere göre daha hızlı hidrolize olur.

PGA, PLA'dan farklı olarak metil yan gruplarına sahip olmadığı için daha kristal yapıdadır. Ayrıca, laktik asit glikolik aside göre daha hidrofobik olduğundan, yüksek laktik asit içeren PLGA kopolimerleri daha az hidrofildir ve daha az su emerek daha yavaş bir bozunma hızına sahiptir (Schliecker vd., 2003).

2.2.4. PLGA'nın biyolojik ayrışması

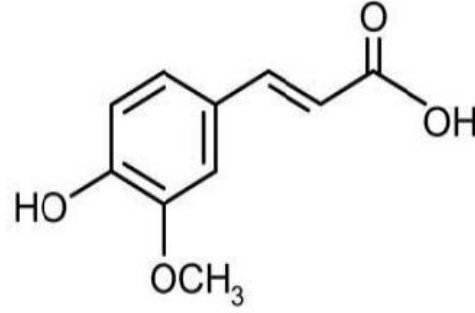
Hem laboratuvar ortamında hem de canlı organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar, PLGA kopolimerlerinin su ortamında omurga ester bağlarının hidroliz veya biyolojik bozunma yoluyla çözüldüğünü göstermiştir. Bu süreçte polimer zincirleri homojen bir şekilde bozunur ve genellikle PLGA matrisi boyunca eşit bir oranda gerçekleşir. Biyolojik bozunmanın şişmiş polimerin hidrolitik zincir bölünmesiyle gerçekleştiği saptanmıştır. PLGA zincirlerindeki karboksil uç gruplarının sayısı, biyobozunma sürecinde polimer zincirlerinin ayrı ayrı bölünmesiyle artar. Bu grupların biyolojik bozunmayı katalizlediği bilinmektedir. Ayrıca büyük parçaların iç kısımda daha hızlı bozunduğu ve amorf bölgelerin kristal bölgelere göre daha hızlı bozunduğu bildirilmiştir. PLGA kopolimerlerinin biyolojik bozunma hızı, laktik asit ve glikolik asit molar oranına, polimer moleküler ağırlığına, kristallik derecesine ve polimerin cam geçiş sıcaklığına (Tg) bağlıdır (Muthu, 2009).

2.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, benzen halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu ve fonksiyonel grup bulunan doğal antioksidanların aktif temsilcileridir. Bu bileşikler, başlıca bitkilerden elde edilir ve çeşitli terapötik etkilere sahiptir (Atak ve Uslu, 2017). Antialerjik, antimikrobiyal, antiarterojenik, antitrombotik, antiinflamatuvar, vazodilatör, antiviral gibi terapötik etki gösteren en yaygın fitokimyasal grubundan biridir (Kaşık vd., 2019).

2.3.1. Ferulik asit

Ferulik asit, son yıllarda ilaç endüstrisinde popülerlik kazanmıştır, çünkü düşük toksisiteye sahiptir ve antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser, antibakteriyel ve antidiyabetik etkilere sahiptir. Ferulik asit gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde aktif bileşen olarak sıklıkla kullanılır (Zduńska vd., 2018). Ferulik asit'in kimyasal yapısı Şekil 2.8.'de sunulmuştur.



Şekil 2.8. Ferulik asit kimyasal yapısı (Phadke vd., 2021)

Trans ferulik asit [(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid], *Ferula foetid* bitkisinden izole edilmiş ve adını aldığı bitkiden türetilmiştir (Kumar ve Pruthi, 2014). Ferulik asit, 1925 yılında sentezlenmiş, doymamış yan zincirler içeren, cis ve trans izomerleri bulunan bir polifenoldür (Kumar ve Pruthi, 2014).

Ferulik asitin yara iyileşmesini hızlandırıcı, anjiyogenezi arttırıcı ve melanogenezi inhibe edici etkilere sahip ve ana deri yapıları için koruyucu bir role sahip olduğu bilinmektedir. Ferulik asit, bitkilerde bulunan sinamik asitle yakından ilişkilendirilen fenilalanin ve tirozin metabolizması sırasında Shikimate yoluyla sentezlenir. Analjezik, antiinflamatuar, antidiyabetik, antikanser, nöroprotektif ve kardiyoprotektif gibi terapötik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca yapısında bulunan fenolik hidroksil grubu nedeniyle oldukça güçlü bir antioksidan özellik sergiler ve serbest radikallerin etkili bir temizleyicisidir. Bazı otoriteler lipid peroksidasyonunu engellenmesi amacıyla ferulik asiti gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır (Gohil vd., 2012; Kumar ve Pruthi, 2014; Zhou vd., 2017). Ferulik asit ve ilgili ester türevleri genellikle antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu bileşikler, serbest radikallerin nötralizasyonu yoluyla oksidatif stresi azaltabilir ve hücrelerdeki hasarı önleyebilir. Bakteriyal endotoksin lipopolisakkaritleri, prostaglandin E2 ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-a) gibi bazı hücre içi enflamatuar araçlar, hücrel inflamasyon süreçlerini etkileyebilir (Kaşık vd., 2019)

2.3.1.1. Ferulik asidin terapötik etkileri

2.3.1.1.1. Ferulik asidin antidiyabetik etkisi

Diyabet, insanlarda en yaygın görülen endokrin hastalıktır ve hiperglisemi, aşırı serbest radikal üretimi ve oksidatif stres ile ilişkilidir. Oksidatif stres, hücrel hasara yol açarak pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Ferulik

asit, pankreasta bulunan serbest radikalleri nötralize ederek streptozotosin kullanımıyla indüklenen toksisiteyi azaltmaya yardımcı olur. Ferulik asit uygulamasının streptozotosin ile diyabetik hayvanlarda kan glukoz seviyelerini kontrol ettiği gösterilmiştir (Kumar ve Pruthi, 2014).

2.3.1.1.2. Ferulik asidin antikanser etkisi

Kanser etiyolojisinde serbest radikal önemli bir rol oynar. Bu nedenle diyetle bulunan antioksidanlar, terk edilmiş hücre büyümesinin potansiyel inhibitörleri olarak titizlikle değerlendirilmeye sahiptir. Ferulik asidin antikanserojen aktivitesi, ROS'un temizleme ve sitoprotektif enzimleri uyarma kapasitesiyle ilgilidir. Böylece ferulik asit lipid peroksidasyonunu, DNA tek sarmallı yırtılmayı, belirli proteinlerin inaktivasyonunu ve biyolojik zarların bozulmasını azalmıştır. Lökositleri ve diğer hücrelerde serbest radikallerin inşası nedeniyle, nikotinin akciğer kanserinin patogeneğinde anahtar bir role sahiptir (Barone vd., 2009). Sudheer ve ark. sıçan periferik kan lenfositleri üzerinde çalıştı ve ferulik asidin nikotin kaynaklı lipid peroksidasyonu ve GSH (indirgenmiş glutatyon) seviyesinde azalmayı önlediği sonucuna varılmıştır (Sudheer vd., 2007).

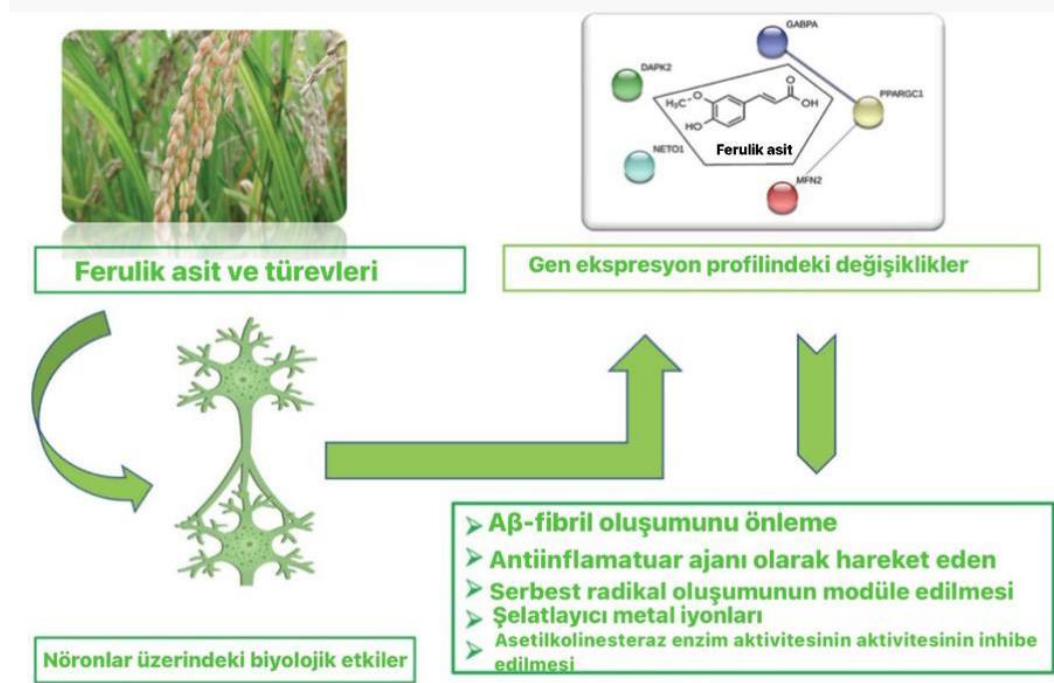
2.3.1.1.3. Ferulik asidin kardiyovasküler etkisi

Nikotin, tütün dumanının ana bileşiklerinden biridir ve oksidatif hücre hasarına neden olan artan lipid peroksidasyona yol açar. Bu durum sigaraya bağlı birçok hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar. Ferulik asit kullanımı, nikotin zararına karşı reaksiyonlara yol açabilir. Ancak ferulik asit, hücreleri oksidatif hasardan koruyan endojen antioksidan savunmayı önemli ölçüde artırır. Ferulik asit, serbest radikallerin hücre zarına saldırmasını engelleyerek zararın korunmasına yardımcı olur (Sudheer vd., 2005; Warren ve Singh, 2013). Ayrıca, ferulik asit sodyum tuzu, serum lipitlerini azaltma, trombosit agregasyonunu inhibe etme ve kan pıhtısı oluşumunu engelleme gibi etkiler göstermiştir (Wang vd., 2004).

2.3.1.1.4. Ferulik asidin antialzheimer özelliği

Alzheimer hastalığı (AD), tüm demans vakalarının başlıca nedenidir ve ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalık, β -amiloid ($A\beta$) protein birikimi ve hiperfosforile tau proteini gibi faktörler tarafından tetiklenir. Son on yılda, Alzheimer hastalığının tedavisi için $A\beta$ birikimi, hiper-fosforile tau proteini, mitokondriyal işlev

bozukluğu ve oksidatif stres gibi hedeflere yönelik çeşitli uygulamalar geliştirilmiştir (Turkez vd., 2022). Alzheimer hastalığında potansiyel uygulamalar açısından ferulik asit ve türevlerinin terapötik kullanımları şematik olarak Şekil 2.9.'da sunulmuştur.

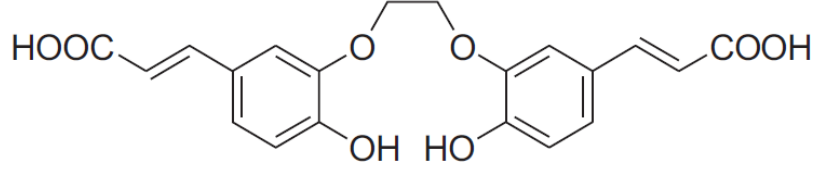


Şekil 2.9. Alzheimer hastalığında potansiyel uygulamalar açısından ferulik asit ve türevlerinin terapötik kullanımları (Turkez vd., 2022)

Ferulik asidin çekirdeğinde ve yan zincirinde çift bağ konjugasyonunun varlığı nedeniyle güçlü antioksidan kapasitesi sağlamaktadır. Ferulik asit ve türevlerinin kan beyin bariyerini geçme ve yeterli konsantrasyonda merkezi sinir sistemine geçme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Phadke vd., 2021). Ferulik asit bir antiinflamatuvar ajan olarak hareket ederek Aβ-fibril oluşumunu önleyerek nöroproteksiyon uygular, serbest radikal oluşumunu ve asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChe)'ın enzim aktivitesinin inhibe edilmesini sağlar. Kan beyin bariyerini geçebilecek fizikokimyasal özelliklere sahiptir böylece merkezi sinir sistemine yeterli konsantrasyonda etki etmektedir (Phadke vd., 2021; Turkez vd.,2022).

Jung ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildiği çalışmada ferulik asidin dimerik türevlerinden biri olan KMS4001 ile tedavi edilen farelerin yeni nesne tanıma belleğinde önemli ölçüde iyileşme olduğu, 5 günlük 30 mg/kg dozunda ön tedavide hafıza bozukluğunu etkili şekilde bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca oral uygulanan KMS4001'in

uygun bir biyoyararlanıma sahip olduğu gösterilmiştir (Jung vd., 2016). KMS4001'in kimyasal yapısı Şekil 2.10.'da sunulmuştur.



Şekil 2.10. KMS4001'in yapısı (Jung vd., 2016)

Sgarbossa ve arkadaşlarının yayınladığı araştırmada oksidatif stresin AD nöropatolojisine katkıda bulunduğu kabul edilmektedir ve hastalığın transgenik fare modellerinde β -amiloid birikintilerini çevreleyen nöronlarda oksidatif stres belirteçlerinin arttığı bulunmuştur. Ferulik asit, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği sebebiyle uzun süreli uygulanmasında β -amiloid tarafından indüklenen öğrenme ve hafıza kusurlarına hkarşı koruduğu bildirilmiştir(Sgarbossa vd., 2015).

Yapılan çalışmalar ferulik asit ve türevlerinin nörodejeneratif hastalıklara karşı bir ilaç olarak kullanımını teşvik etmektedir (Jung vd., 2016; Sgarbossa vd., 2015).

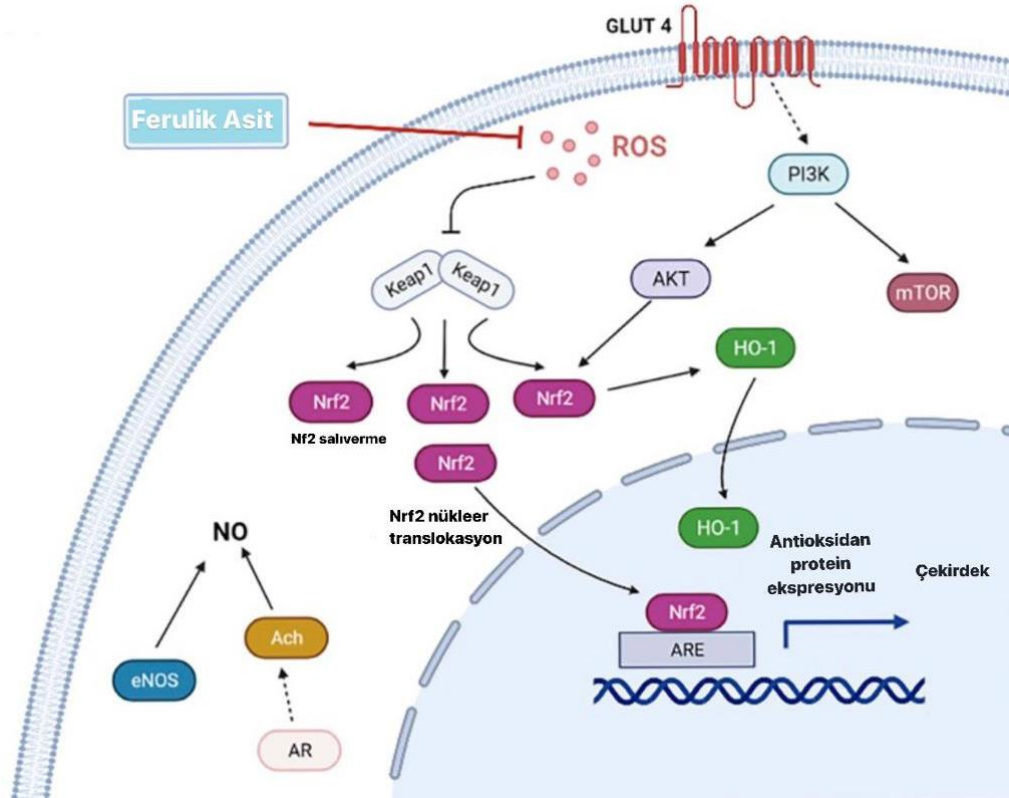
2.3.1.1.5. Ferulik asidin antioksidan özelliği

Ferulik asit, fenolik hidroksil grubundan bir hidrojen atomunu serbest radikallere karşı vererek antioksidan aktivite sergileyen diğer fenoller gibi çalışır (Kumar ve Pruthi, 2014). Kikuzaki ve arkadaşlarına göre, ferulik asidin antioksidan aktivitesi, ferulik asit esterleri ve kumarik asitten daha yüksektir (Kikuzaki vd., 2002).

Oksidatif stres (OS), vücutta oksidatif ve antioksidan arasındaki dengesizlik durumudur ve bu durum tüm vücudu oksidasyona karşı hassas hale getirir. Oksidatif stres, inflamatuvar nötrofil infiltrasyonuna, artan proteaz salınımına ve aşırı proteaz üretimine yol açar. Oksidatif ara ürünler, doku rejenerasyonu, erken yaşlanma, apoptozis, hücre dönüşümü ve kansere yol açabilir. Ferulik asit, antioksidan etkilerini oksidatif serbest radikalleri temizleyerek, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu engelleyerek ve çeşitli sinyal yollarına katılarak gösterir (Li D. vd., 2021).

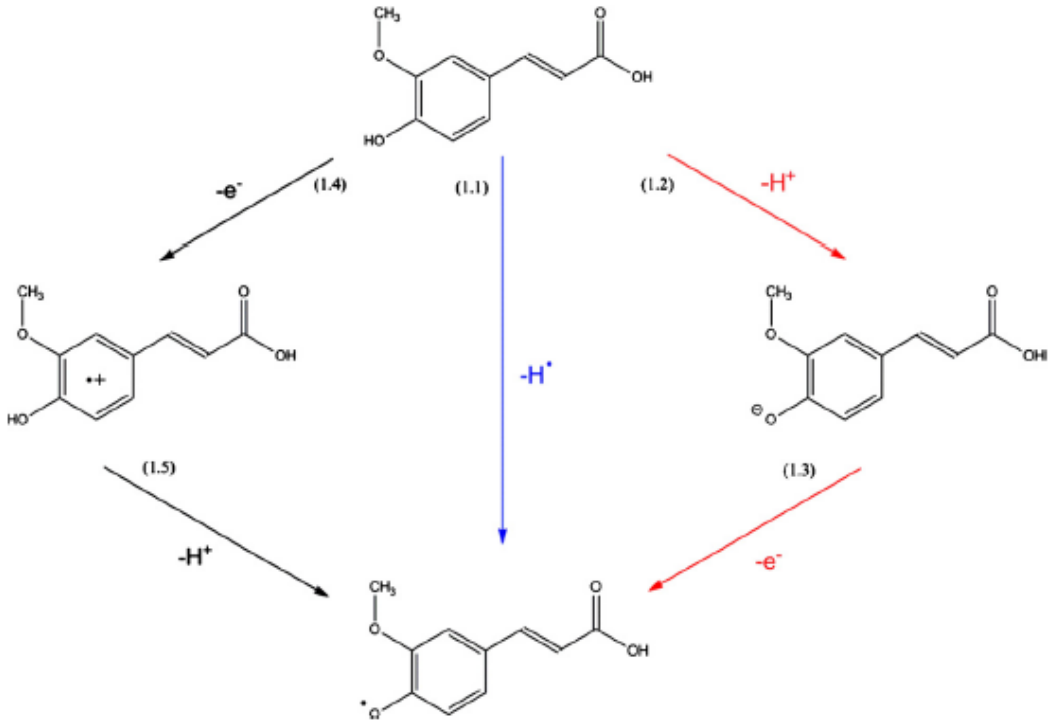
ROS, vücut uzun süre oksijene maruz kaldığında oluşan bir tür oksijenattır. Vücudun antioksidan mekanizmaları, oksidasyonu engelleyerek ROS birikimini önler ve hasarı onarır. Ancak, ROS üretimi ile vücudun antioksidan mekanizması arasındaki

dengesizlik, oksidatif stres üretiminin artmasına ve büyük miktarda ROS üretimine yol açar. Ferulik asidin fare glomerüler podositlerinde glikoz kaynaklı ROS üretimindeki artışı azaltarak hücre hasarını hafiflettiği bulunmuştur. Ferulik asidin antioksidan moleküler mekanizması şemada gösterilmiştir (Choi R. B. vd., 2011; Li D. vd., 2021). Ferulik asidin antioksidan etkisinde yer alan moleküler yollar Şekil 2.11.'de sunulmuştur.



Şekil 2.11. Ferulik asidin antioksidan etkisinde yer alan moleküler yollar (Li D. vd., 2021)

Ferulik asidin antioksidan yetenekleri, yapısal özellikleriyle yakından ilişkilidir. Fenolik çekirdek ve doymamış yan zincirler sayesinde, ferulik asit kolayca rezonansla stabilize edilmiş fenoksi radikalleri oluşturarak güçlü antioksidan aktivite sergiler (Srinivasan vd., 2007). Ferulik asidin antioksidan özellikleri ve kimyasal reaksiyonları Şekil 2.12.'de sunulmuştur.



Şekil 2.12. Ferulik asidin antioksidan özellikleri (Urbaniak vd., 2013)

Reaktif radikallerle etkileşen ferulik asit, hidrojen atomlarını kolaylıkla uzaklaştırır. Oluşan fenoksi radikali, yüksek rezonans stabilitesine sahiptir. Eşleştirilmemiş elektron sadece oksijende kalabilirken, aynı zamanda molekül boyunca yayılarak delokalize olabilir. Doymamış yan zincirlerde yoğun konjugasyonla elde edilen rezonans stabilizasyonu, ferulik asidin güçlü antioksidan kapasitesini açıklar.

Fenoksi radikali, radikal zincir reaksiyonunu başlatamaz veya devam ettiremez. Genellikle başka bir radikal ile çarpışır ve birleşir. Bu tür reaksiyonlar, bir dizi ürünü içeren, hala serbest radikalleri yakalayabilen fenolik hidroksil grubu içerir. İkinci bir fenolik hidroksil grubunun varlığı, ek rezonans stabilizasyonu ve o-kinon oluşumuyla radikal süpürme aktivitesini önemli ölçüde artırır (Srinivasan vd., 2007).

2.3.1.2. Ferulik asidin özellikleri

2.3.1.2.1. Ferulik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Ferulik aside ait temel fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.4.'de verilmiştir.

Tablo 2.4. Ferulik asidin temel fiziksel ve kimyasal özellikleri (Mota vd., 2008; PubChem, 2004)

Kimyasal Formülü	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
IUPAC (uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği) ismi	(E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenol) prop-2-enoik asit
CAS (kimyasal özet hizmeti) numarası	537-98-4
Molekül ağırlığı	194.2 g/mol
Renk	Açık sarı
Kaynama Noktası	372-373 °C
Erime Noktası	168-171 °C
Buhar Basıncı	0.00000269 [mmHg]
Fiziksel Hali	Toz
pKa	4,61
Çözünürlük	Metanolde serbest çözünür, Sudaki çözünürlüğü 0.78 g/L

2.3.1.2.2. Ferulik asidin farmakokinetiği

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ferulik asidin farmakokinetiği araştırılmıştır. Yapılan çalışma ferulik asit'in hızlı emilimini ve dağılımını kanıtlamıştır. Ferulik asit tek bir oral uygulamadan sonra düşük biyoyararlanımla hızla emilmiş fakat Honghua (yaygın bir Çin bitkisi) veya klopidogrel ile kombine edilen tek bir doz ferulik asit'in Eğri altında kalan alan (EAA), C_{maks} ve T_{maks} değerlerini önemli ölçüde arttırabilir olduğu bu durumun ferulik asit'in biyoyararlanımını arttırabilir olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Li vd., 2011). Yan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intragastrik (ig) uygulamasından sonra, ferulik asit doruk plazma konsantrasyonuna 15 dakikada ulaşmış ve ardından kademeli olarak azaldığı ve 150 dakika sonunda neredeyse saptanamaz hale geldiği gözlenmiştir. İg uygulamasında görülen ilaç plazma seviyelerinde “zirveleri ve dipleri” ortadan kaldırayabileceğini ve transdermal uygulamanın oynadığını bildirdi ve ferulik asidin uzun ve yavaş kontrollü salınımında rol üstlendiği gösterilmiştir (Yan vd., 2020).

2.3.1.2.3. Ferulik asidin toksisitesi

Ferulik asit, düşük toksisiteye sahip bir fitokimyasal olarak bilinir. Choi J. H. ve diğeri tarafından yapılan bir çalışmada, ferulik asidin trombositler, lökositler ve eritrositler üzerinde herhangi bir önemli toksisiteye neden olmadığı gözlemlenmiştir (Choi J. H. vd., 2018). Ayrıca, başka bir *in vitro* çalışma, ferulik asidin 10 ve 20 mg.mL⁻¹ konsantrasyonlarında insan monositlerinin ve kolon hücrelerinin proliferasyonunu ve canlılığını azalttığını, ancak 40 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir (Truzzi vd., 2020).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

<u>Madde adı</u>	<u>Firma adı</u>
Aseton	Merck, Almanya
ABTS ^{•+}	Sigma-Aldrich, Almanya
BHT	Sigma-Aldrich, Almanya
DPPH [•]	Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Pluronic F-68	BASF, Almanya
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich, Almanya
Resamer RG 503H	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya
Span 60	Sigma-Aldrich, Almanya
Trehaloz	Sigma-Aldrich, Almanya
Tween 80	Merck, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çoklu manyetik karıştırıcı	IKA RT-15, Çin
Çalkalamalı su banyosu	N-biotek NB-303, Güney Kore
Derin dondurucu	Liebherr LGEX3410 Medline, Almanya
Distile su cihazı	Sartorius Arium Pro VF, Almanya
Hassas terazi	Mettler Toledo AM 100, Amerika
Infrared spektrofotometresi	Shimadzu UV-160A, Japonya
Liyofilizatör	Operon, Kore
Manyetik karıştırıcı	Jeitech MS-53M, Güney Kore
Mikropipet Seti	Eppendorf, Almanya
Parçacık boyutu analiz cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS, İngiltere
pH metre	Mettler Toledo Seven Compact, Amerika
Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Kore
Vorteks karıştırıcı	Scilogex MX-S, Amerika
Zeta potansiyeli analiz cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS, İngiltere

4. YÖNTEM

4.1. UV Spektrofotometre validasyon çalışmaları

In vitro çalışmalarda ferulik asit için miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enkapsülasyon etkinliği çalışmaları ve *in vitro* dissolüsyon çalışmaları için iki farklı validasyon çalışması yapılmıştır.

4.1.1. Ferulik asit için Aseton : Su (1:1, h/h) ortamında validasyon çalışması

Yöntemin uygunluğunun araştırılması ve bu amaç doğrultusunda yeterli, güvenilir aynı zamanda tekrarlanabilir sonuçların alınması analitik yöntem validasyonunun ana amacıdır. Ferulik asit için aseton: su (1:1, h/h) ortamında miktar tayini validasyonunda doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri inceleme parametresi olarak seçilmiş ve istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu çalışmanın değerlendirilme Uluslararası Harmonizasyon Birliği'nin (ICH) kriterlerine göre yapılmıştır (Dagron, 2014).

4.1.1.1. Absorbans belirleme çalışmaları

Enkapsülasyon etkinliği çalışmalarında kullanmak üzere ferulik asit için aseton: su (1:1, h/h) ortamında miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması amacıyla öncelikle ilk olarak 25 mg ferulik asit tam olarak tartılmış, bir miktar aseton: su (1:1, h/h) ile yıkanarak balon jöjeye aktarılmış ve son olarak 25 mL hacime aseton: su (1:1, h/h) karışımı ile tamamlanmıştır. Bu çözelti on dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonuç olarak stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonun $1000.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmasından hareketle farklı seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometrede maksimum absorbans'ın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Jain vd., 2011).

4.1.1.2. Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için üç farklı stok çözeltilerden 2.0 ile $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ arasında 6 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti için analizler 3 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 326 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bulunan absorbans değerleri ile regresyon analizi

yapılıp ferulik asit'e ait kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) elde edilmiştir (Silva-Buzanello vd., 2015).

4.1.1.3. Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda 3 farklı günde ($4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ferulik asit içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (Öztürk, 2017).

4.1.1.4. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntemle elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için 3 farklı konsantrasyonda ($4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 3'er kez tekrarlanmıştır (Araújo vd., 2013).

4.1.1.5. Duyarlılık

Tespit sınırı (LOD), numunede tespit edilebilecek en düşük analit miktarıdır. Ölçüm limiti (LOQ) uygun kesinlik ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen numune içindeki analit miktarlarının en düşük olmasıdır. Analitik yöntem validasyon çalışması için LOD ve LOQ değerleri standart sapma yöntemi kullanılarak Denklem 4.1. ve Denklem 4.2. yardımıyla ICH yönergelerine göre hesaplanmıştır. Denklem 4.1 ve Denklem 4.2'de yer alan σ = yanıtın standart sapması; S= regresyon çizgisinin eğimidir (Kumari B. ve Khansili, 2020; Yasir vd., 2019).

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (4.1.)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (4.2.)$$

4.1.1.6. Seçicilik

Yöntemin özgülüğü/seçiciliği için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar ferulik asit ve A-Blank (Blank formülasyon) için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Araújo vd., 2013).

4.1.2. Ferulik asit için %1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması

4.1.2.1. Absorbans belirleme çalışmaları

In vitro dissolüsyon çalışmalarından önce ferulik asit için % 1 Tween 80 içeren fosfat tamponu (PBS) pH 7.4 ortamında validasyon çalışmaları UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için öncelikle 25 mg ferulik asit tam olarak tartılmış ve bir miktar % 1 Tween 80 PBS pH 7.4 çözeltisi ile yıkanarak balon jöjeye alınmıştır. 25 mL'e % 1 Tween 80 PBS pH 7.4 çözeltisi ile tamamlanmış ardından oluşan çözelti on dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonuç stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonunun $1000.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmasından hareketle, seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometride maksimum absorbans'ın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Jain vd., 2011).

4.1.2.2. Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için üç farklı stok çözeltilerden 2.0 ile $12.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ arasında 6 farklı derişimde çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti için analizler 3 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 307 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bulunan absorbans değerleri ile regresyon analizi yapıp ferulik asit'e ait kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) elde edilmiştir (Silva-Buzanello vd., 2015).

4.1.2.3. Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda 3 farklı günde ($4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ferulik asit içeren

çözeltiler hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltilerin her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (Öztürk, 2017).

4.1.2.4. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntemle elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için 3 farklı konsantrasyonda ($4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 3'er kez tekrarlanmıştır (Araújo vd., 2013).

4.1.2.6. Duyarlılık

%1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında yapılan validasyon çalışması için LOD ve LOQ analizleri '4.1.1.5. Duyarlılık' bölümünde yer verilen Denklem 4.1. ve Denklem 4.2. yardımı ile hesaplanmıştır (Kumari B. ve Khansili, 2020; Yasir vd., 2019).

4.1.2.6. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü/seçiciliği, UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar ferulik asit ve A-Blank (Blank formülasyon) için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Araújo vd., 2013).

4.2. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması

Ferulik asit zayıfça çözünür bir etkin maddedir (Rezaei vd., 2019). Bu sebeple literatür araştırması sonucunda bu tez çalışması kapsamında hazırlanan PLGA nanopartikülleri 'Nanoçöktürme' yöntemi kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir (Öztürk vd., 2019b; Şenel ve Öztürk, 2019). Formülasyon ön deneme çalışmalarında Span ve Poloksamer-188 isimli yüzey etkin maddelerin konsantrasyonları değiştirilerek deneme çalışmaları yapılmış ve uygun sonuçlara göre optimum formülasyon seçilmiştir. İlgili çalışmada özel bir PLGA türevi olan Resomer RG 503 H isimli polimer ile çalışılmıştır. Hazırlanan blank formülasyonların ve ferulik asit içeren formülasyonun içerikleri sırasıyla Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Formülasyon ön denemelerinde hazırlanan formülasyon içerikleri

Kod	Organik faz				Sulu faz
	PLGA	Span 60	Ferulik asit	Aseton	
A-Blank	75 mg	25 mg	-	4 mL	10 mL, % 0.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
B-Blank	75 mg	30 mg	-	4 mL	10 mL, % 0.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
C-Blank	75 mg	35 mg	-	4 mL	10 mL, % 0.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
D-Blank	75 mg	25 mg	-	4 mL	10 mL, % 1.0 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
E-Blank	75 mg	30 mg	-	4 mL	10 mL, % 1.0 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
F-Blank	75 mg	35 mg	-	4 mL	10 mL, % 1.0 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
G-Blank	75 mg	25 mg	-	4 mL	10 mL, % 1.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
H-Blank	75 mg	30 mg	-	4 mL	10 mL, % 1.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
I-Blank	75 mg	35 mg	-	4 mL	10 mL, % 1.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi

Tablo 4.2. Optimum olarak seçilen formülasyonun içeriği

Kod	Organik faz				Sulu faz
	PLGA	Span 60	Ferulik asit	Aseton	
A-Blank	75 mg	25 mg	-	4 mL	10 mL, % 0.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi
A-FA	75 mg	25 mg	7.5	4 mL	10 mL, % 0.5 (a/h) Poloksamer-188 çözeltisi

4.2.1. A-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen A-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 25 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 0.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.2. B-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen B-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 30 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 1.0 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.3. C-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen C-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 35 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 1.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.4. D-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen D-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 25 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 0.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.5. E-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen E-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 30 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 1.0 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.6. F-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen F-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 35 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızındaki manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 1.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.7. G-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen G-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 25 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 0.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.8. H-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen H-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 30 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızındaki manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 1.0 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.9. I-Blank kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Etkin madde içermeyen I-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması için öncelikle tam olarak tartılan 75 mg Resomer RG 503 H ve 35 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 1.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.10. A-FA kodlu ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonun hazırlanması

Ferulik asit içeren A-FA kodlu PLGA nanopartikül formülasyonun hazırlanması için öncelikle 7.5 mg ferulik asit, 75 mg Resomer RG 503 H ve 25 mg Span 60, organik faz olarak seçilen 4 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Elde edilen bu çözelti 5 mL.saat⁻¹ hızda 100 rpm karıştırma hızında olan manyetik karıştırıcı üstündeki Poloksamer 188 sulu çözeltisine (% 0.5 *a/h*, 10 mL) damlatılmıştır.

Damlatma sonrasında aseton manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.3. Nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

4.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel

Nanopartiküllerin parçacık boyutu ve parçacık boyut dağılım / polidispersite indeksi (PDI), Zetasizer Nano (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) cihazı ile dinamik ışık saçılımı tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan nanopartiküllerin parçacık boyut ve PDI değerleri, taze hazırlanmış formülasyonların distile suda dağıtılmasıyla analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin Zeta (ζ) potansiyel değerleri, 25 °C oda sıcaklığında tek kullanımlık katlanmış bir kılcal zeta hücrede aynı cihaz kullanılarak belirlenmiştir. Tüm formülasyon numuneleri üç kopya halinde ölçülmüş ve ölçümlerin ortalama değerleri ve standart sapması hesaplanmıştır (Baghirova vd., 2023).

4.3.2 Dondurma ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) üzerinde kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi

4.3.2.1 Dondurma işlemine trehaloz etkisi

Dondurma işlemine trehalozun kriyoprotektan etkisinin belirlenmesi için 1 set optimum olarak seçilen formülasyon A-FA kodlu formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan taze formülasyonun parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Ardından hazırlanan A-FA kodlu formülasyon üzerine santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada trehaloz çözeltisi (% 5.0, *a/h*) hazırlanmış ve 0.22 μm membran filtreden süzölmüştür Santrifüje edilen partiküllerin yıkama proseslerinin ardından üzerine % 5.0 (*a/h*) konsantrasyonunda hazırlanan trehaloz çözeltisinden 2 mL eklenip vortekslenmiştir. Trehaloz çözeltisi eklenen formülasyon eppendorf tüplerinde 8 eşit kısma ayrılmış (8 tüp) ve bu tüplere sırasıyla % 5.0 *a/h* konsantrasyondaki trehaloz çözeltisinden 1. tüpe 0 μL , 2. tüpe 100 μL , 3. tüpe 200 μL , 4. tüpe 300 μL , 5. tüpe 400 μL , 6. tüpe 600 μL , 7. tüpe 750 μL , 8. tüpe 900 μL eklenmiştir. Tüm tüpler -20°C'de buzdolabında dondurulmuştur. Tüm tüpler dondurmanın ardından buzdolabından çıkarılmış ve buzun çözünmesinin ardından vortekslenerek nanopartiküllerin dağıtılması sağlanmıştır. Her tüp için parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Tüm bu çalışma boyunca elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak optimum formülasyonda dondurma işlemi nanopartikül özelliklerinin değişmemesi için en iyi trehaloz oranı belirlenmiştir (Öztürk vd., 2019c; Öztürk vd., 2019b; Öztürk ve Yurtdaş Kirimlioğlu, 2019e).

4.3.2.2. Liyofilizasyon işlemine trehaloz etkisi

Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi için 1 set optimum olarak seçilen formülasyon A-FA kodlu formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan taze formülasyonun parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Ardından hazırlanan A-FA kodlu formülasyon üzerine santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada trehaloz çözeltisi (% 5.0, *a/h*) hazırlanmış ve 0.22 µm membran filtreden süzölmüştür Santrifüje edilen partiküllerin yıkama proseslerinin ardından üzerine % 5.0 (*a/h*) konsantrasyonunda hazırlanan trehaloz çözeltisinden 5 mL eklenip vortekslenmiştir. Trehaloz çözeltisi eklenen formülasyon eppendorf tüplerinde 12 eşit kısma ayrılmış (12 tüp) ve bu tüplere sırasıyla % 5.0 *a/h* konsantrasyondaki trehaloz çözeltisinden 1. tüpe 0 µL, 2. tüpe 100 µL, 3. tüpe 200 µL, 4. tüpe 300 µL, 5. tüpe 400 µL, 6. tüpe 600 µL, 7. tüpe 750 µL, 8. tüpe 900 µL, 9. tüpe 1050 µL, 10. tüpe 1300 µL, 11. tüpe 1450 µL, 12. tüpe 1600 µL eklenmiştir. Tüm tüpler - 20°C’de buzdolabında dondurulmasının ardından liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonucu, liyofilize toz nanopartikül formülasyonlarının üzerine 1 mL distile su eklenip vortekslenerek dağıtılmıştır. Her tüp için parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Tüm bu çalışma boyunca elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak optimum formülasyonun saklanmasıdaki en iyi trehaloz oranı dolayısıyla en iyi saklama koşulu belirlenmiştir (Öztürk vd., 2019c; Öztürk vd., 2019b; Öztürk ve Yurtdaş Kirimlioğlu, 2019e).

4.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme

Polimerik nanopartiküllerin kararlılıklarında PLGA gibi hidrolitik bozunur polimerlerden yapılmış nanopartiküllerin zamanla bozunduğu bilinmektedir. Uzun vadeli kararlılıkta pH ve sıcaklık önemli etkiye sahiptir. Bu tez kapsamında hazırlanan A-FA kodlu PLGA nanopartikül formülasyonunun kısa süreli kararlılıklarını incelemek için bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışmaya başlamadan önce gastrointestinal (GİS) sıvıları taklit eden çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler sırasıyla; pH 1.2 HCl tamponu (Çözelti 1), pH 6.8 fosfat tamponu (Çözelti 2) ve pH 7.4 fosfat tamponu (Çözelti 3). Bu üç çözelti ve distile su (toplam 4 adet falkon tüpü); gastrointestinal ortamı taklit edecek 37±1°C sıcaklıkta 50 rpm karıştırma hızında çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. 1 set A-FA kodlu optimum formülasyon hazırlanmış ve yıkama işlemleri sonrası 4 mL’e

tamamlanmıştır. 37±1°C’de inkübe olan üç çözelti ve distile su içine hazırlanan nanopartikül dispersiyonundan 1 mL eklenmiş ve eklendiği andan itibaren 1. saat, 3. saat, 6. saat, 9. saat, 24. saat her bir tüpten örnek alınarak parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonuçları doğrultusunda PLGA nanopartiküllerinin hangi gastrointestinal ortamda daha kararlı oldukları belirlenmiştir (Martín-Banderas vd., 2012).

4.3.4. Enkapsülasyon etkinliği

PLGA bazlı A-FA kodlu nanopartikül formülasyonuna ferulik asit yüklemesi, ‘4.1.1. Ferulik asit için aseton: Su (1:1, h/h) ortamında validasyon çalışması’ bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile belirlenmiştir. A-FA yüklü PLGA bazlı nanopartikül formülasyonun ferulik asit içeriği doğrudan ilacın nanopartikül formülasyonundan ekstrakte edilmesi ile değerlendirilmiştir. Liyofilize nanopartikül 5 mg olacak şekilde hassas terazi ile tartılmıştır. Ardından üzerine 1 mL aseton: su (1:1, h/h) ilave edilmiş ve partikülleri çözmek için 5 dakika vortekslenmiştir. Vorteksleme işlemi sonrası hazırlanan çözelti 0.22 µm membran filtre ile süzülüş, gerekli seyreltmeler ardından ferulik asit miktar tayini için UV spektrofotometrede 326 nm’de analiz edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) olarak ifade edilmiş ve Denklem 4.3. ile hesaplanmıştır (Martín-Banderas vd., 2012).

$$\% EE = \frac{\text{Enkapsüle edilen ferulik asit miktarı}}{\text{Formülasyonda bulunan teorik ferulik asit miktarı}} \times 100$$

(4.3.)

4.3.5. In vitro dissolüsyon

Ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun *in vitro* dissolüsyon profilini belirlemek için 24 saatlik bir dissolüsyon çalışması yapılmıştır. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonundan ferulik asit dissolüsyonu diyaliz membran yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Ferulik asit (5 mg) ve A-FA (5 mg’a eşdeğer miktarda ferulik asit içeren miktarda) kodlu nanopartikül formülasyonu selüloz asetat diyaliz membranı (molekül ağırlığı:12-14 kDa) içerisine konulmuş ardından üzerlerine 2 mL çözündürme ortamı (% 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4) eklendikten sonra diyaliz membranının her iki ucu özel aparatlar ile kapatılmıştır. Hazırlanan diyaliz membranları, 100 rpm’de devamlı olarak karışan 37±0.5°C’de 80 mL hacimdeki çözünme ortamı içine atılmıştır.

Dissolüsyon ortamı olarak (% 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 kullanılmıştır. Analizlerde hata olmaması ve çözünme ortamının buharlaşmasını önlemek için reseptör kompartman alüminyum folyo ile sıkıca kapatılmıştır. 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. Saatler sonrası 3 mL numune alınmış ve aynı hacim yerine taze çözünme ortamı (% 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4) reseptör kompartmana ilave edilmiştir. Ardından numuneler gerekli seyreltmelerin ardından '4.1.2. Ferulik asit için % 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması' bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile 307 nm'de analiz edilmiştir. Sonuçlar % kümülatif çözünen miktar-zaman grafiğine dönüştürülmüştür. Bu çalışma 3 seri saf ferulik asit ve 3 seri ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon için gerçekleştirilmiştir.

4.3.6. Salım Kinetiği

In vitro dissolüsyon çalışmalarında elde edilen veriler ile DDSolver yazılım programı kullanılarak salım kinetikleri araştırılmıştır. Hesaplama süresini kısaltmak, hesaplama hatalarını ortadan kaldırmak ve uygun salım profili/kinetiklerin belirlemek için excel eklentisi olan DDSolver isimli bilgisayar programı kullanılmıştır. Dissolüsyon profilleri elde edildikten sonra, en önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için veriler DDSolver programına aktarılmıştır. Bu kriterler korelasyon katsayısı (R_{sqr} , R^2 veya COD), düzeltilmiş korelasyon katsayısı (R_{sqr_adj} veya $R^2_{adjusted}$), Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Model Seçim Kriteri (MSC)'dir. En yüksek R^2 , $R^2_{adjusted}$ ve MSC değerleri ve en düşük AIC değerleri kinetik modelleri değerlendirmek için seçim kriteri olarak kullanılmıştır (Öztürk ve Güven, 2019d; Yenilmez vd., 2023).

4.4. Katı hal karakterizasyonları

4.4.1. Termal analiz

Termal özellikler, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC, DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI) kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 5 mg numune, alüminyum kroze içinde tartılmış, 50 mL.dk⁻¹ hızdaki hava akımı ve 10°C.dk⁻¹ ısıtma hızı altında 30°C ile 300°C sıcaklık aralığında analiz edilmiştir. A-FA kodlu ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonunun analizine ek olarak, referans ve karşılaştırma açısından saf ferulik asit, A-Blank kodlu formülasyon ve fiziksel karışım analiz edilmiştir (Öztürk vd., 2021).

4.4.2. FT-IR

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizleri FT-IR cihazı (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) ile 4000-500 cm^{-1} dalga boyu aralığında saf ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FT-IR cihazının sıcaklık kontrol mekanizmalı DLATGS dedektörü, dinamik hizalama sistemi ile donatılmış otomatik kurutuculu sızdırmaz Michelson interferometresi (30° geliş açısı) özellikleri bulunmaktadır. Analizlerde kullanılan çözünürlük 0.5 cm^{-1} 'dir (Öztürk vd., 2023a).

4.4.3. $^1\text{H-NMR}$

Dötero aseton içinde çözündürülerek hazırlanan saf ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışımın NMR analizi ($^1\text{H-NMR}$) NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır (Başaran vd., 2022).

4.5. Antioksidan etkinlik çalışmaları

4.5.1. ABTS \bullet^+ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi

ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucunda ABTS \bullet^+ radikal katyonu meydana gelmektedir. Her çalışmadan önce taze olarak hazırlanması gereken bu reaktif, 734 nm dalga boyunda absorbansı $0.700 (\pm 0.02)$ olacak şekilde etanol ile seyreltilerek antioksidan aktivitenin tayinini için kullanılmıştır. İlgili reaksiyonun oluşması için, $10 \mu\text{L}$ test maddesini içeren nanopartikül formülasyonu ve aynı konsantrasyonda test maddesi çözeltisi ve blank üzerine $990 \mu\text{L}$ reaktif çözeltisi eklenerek 5 dakika bekletilmiş ve 734 nm'de verdikleri absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu tez çalışmasında karşılaştırma açısından pozitif kontrol olarak askorbik asit (Vit C) ve kör olarak etanol kullanılmıştır (Re vd., 1999).

Spektrofotometrik ölçüm sonrası ABTS \bullet^+ radikal katyonunun % giderimi denklem 4.4.'e göre göre hesaplanmıştır. Denklem 4.4'te A_{kontrol} , ABTS \bullet^+ reaktif çözeltisinin absorbans değerini belirtmektedir. İlgili denklemde $A_{\text{örnek}}$ formülasyon içeren reaktif çözeltisinin absorbansını belirtmektedir.

$$\text{Total Antioksidan Aktivite (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

4.5.2. Redükleyici güç ölçümü

Redükleyici güç tayini literatüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Li W. vd., 2021). İlk olarak $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (potasyum ferrisiyanid) (%1 *a/h*) ve 200 mM PBS pH 6.6 hazırlanmıştır. Test maddesi içeren nanopartikül, blank formülasyonları ve aynı konsantrasyonda test maddesi çözeltisi üzerine 500 μ L PBS ve 500 μ L $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (%1 *a/h*) ilave edilmiş, karışım 50°C sıcaklıktaki etüvde 20 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda karışıma 500 μ L trikloroasetik asit (TCA) (%10 *a/h*) ilave edilerek santrifüj edilmiştir (4000 rpm, 10 dakika). Santrifüj ardından 500 μ L süpernatant, 500 μ L distile su ve 200 μ L $FeCl_3$ (%0.1 *a/h*) ile karıştırılarak elde edilen reaksiyon çözeltisinin absorbanı, 700 nm dalga boyunda örnek içeren reaksiyon karışımına (kör) karşı okunmuştur (n=3). 700 nm dalga boyunda elde edilen absorbanın 0.5 olduğu konsantrasyon ($mg \cdot mL^{-1}$) EC_{50} değeri olarak verilmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit (Vit C) kullanılmıştır (Lee vd., 2007).

4.5.3. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem

Kararlı bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali bir elektron veya hidrojen kabul etmektedir. Antioksidan maddelerin bir hidrojen atomunu DPPH radikaline verme yetenekleri nedeniyle süpürücü etki gösterdikleri düşünülmektedir. DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi ile antioksidanların stabil DPPH radikalini, indirgenmiş DPPH (DPPH-H) formuna getirme yetenekleri değerlendirilir. Diğer yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç veren önemli bir yöntemdir (Molyneux, 2004). Test edilen örneklerden hazırlanan çözeltilerin DPPH• üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri literatürde verilen yöntemin modifiye edilmesiyle analiz edilmiştir (Sánchez-Moreno vd., 1998). 400 μ L test maddesi içeren nanopartikül, blank ve aynı konsantrasyonda test maddesi çözeltisi üzerine metanolde hazırlanmış 3 mL DPPH ($2 \times 10^{-2} g \cdot L^{-1}$) çözeltisi ilave edilerek 30 saniye boyunca vorteks ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika bekletilmenin ardından 517 nm dalga boyunda absorban değerleri tespit edilmiş, serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan İndeks) denklem 4.5.'e göre hesaplanmıştır. Denklemden $A_{kontrol}$, kontrol absorbanını belirtirken, $A_{örnek}$ test maddesi içeren reaktif çözeltisinin absorbanını belirtir.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

(4.5.)

4.6. *In vitro* AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etkinin ölçülmesi

Test maddelerinin ve test maddelerini içeren nanopartikül ve blank formülasyonlarının butirilkolinesteraz (BuChE) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Ellman Testi kullanılmıştır. Kolorimetrik belirginlik sağlanması için metot modifikasyonları yapılmış olup, modifiye metot uygulanmıştır. Çalışmada, BuChE (at serumundan izole, E.C.3.1.1.8.), AChE (tip VIS *Electrophorus electricus* (electric eel) organizmasından izole, E.C.3.1.1.7.) Ellman belirteci, tampon çözeltileri (potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidroksit), 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), jelatin, asetilkolin iyodür (ATC), sodyum hidrojen karbonat, butirilkolin iyodür (BTC), dimetilsülfoksit (DMSO), donepezil kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler 412 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda (BioTek-Synergy H1 Microplate Reader) gerçekleştirilmiştir (Orhan ve Üstün, 2011).

Çalışma süresince kullanılan distile su Millipore, Milli-Q Synthesis A10 cihazından elde edilmiştir. Kullanılan çözeltilerin tümü taze hazırlanmış olup, stabilite değişimlerinin olmaması açısından 1-2 hafta içerisinde kullanılmalarına dikkat edilmiştir. Test maddelerinin AChE ve BuChE enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi deneyleri 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere 2.5 U.mL⁻¹'lik AChE ve BuChE enzim çözeltileri, 0.075 M ATC ve BTC çözeltileri; 0.01 M DTNB çözeltisi ve 0.1 M pH 8'de fosfat tamponu çözeltisi ve farklı konsantrasyonlarda test çözeltisi hazırlanmıştır.

Bu çözeltiler farklı iki test çözeltisi oluşturacak biçimde karıştırılmıştır. İlk test çözeltisi, her bir kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu çözeltisi, 20 µL DTNB çözeltisi ve 20 µL enzim çözeltisi (AChE ve BuChE'nin her biri için ayrı test çözeltisi hazırlanmıştır) karıştırılarak elde edilmiştir. Diğer test çözeltisi için ise, her bir kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu çözeltisi ve 10 µL ATC veya BTC çözeltisi (ATC ve BTC'nin her biri için ayrı test çözeltisi hazırlanmıştır) karıştırılarak elde edilmiştir. Test çözeltileri 96 kuyucuğun tamamına yeterli olacak miktarlarda hazırlanmıştır.

Öncelikle 20 µL test çözeltisi ve 110 µL birinci test çözeltisi 96 kuyucuklu plakaya her bir konsantrasyon için 4 tekrar oluşturacak şekilde eklenerek 5 dakika karıştırılmış ve 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 80 µL ikinci test çözeltisi eklenerek, 30 saniye hızlı bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Karıştırma işlemi ardından mikrolaka okuyucuda 412 nm dalga boyunda birinci spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir (BioTek-Synergy H1 Microplate Reader) Reaksiyonun sürmesi için 5 dk beklenerek, süre sonunda ikinci spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. İki ölçüm arasındaki absorbans değerleri farkı alınarak Denklem 4.6 yardımıyla % inhibisyon oranları hesaplanmıştır. Denklem 4.6.'dakullanılan kısaltmaların açıklamaları şu şekildedir; A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı; K: Kontrol (sadece test çözeltisinin eklenmediği kuyucuk); B: Blank (test çözeltisinin ve substratın eklenmediği kuyucuk); A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı; A(İ): Test çözeltisine ait absorbans okuma farkı.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{[(A(K) - A(B)) - (A(I) - (B))]}{(A(K) - A(B))} \cdot 100$$

(4.6.)

In vitro antioksidan ve enzimatik aktivite çalışmaları kapsamında sonuçlar inhibisyon hesaplamalarının ardından IC₅₀ verileri SigmaPlot 14.5 programı ile hesaplanarak verilmiştir.

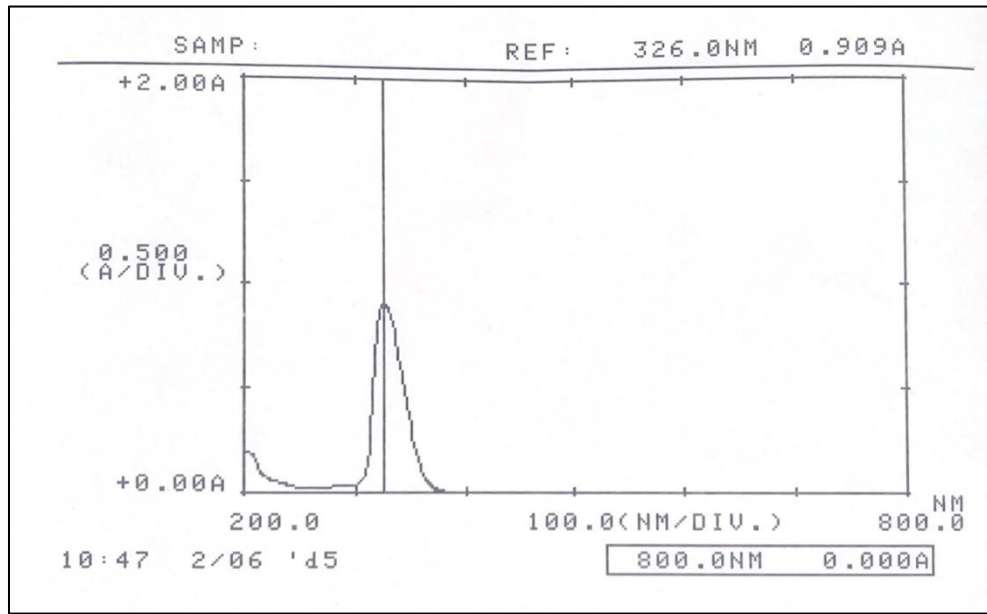
5. BULGULAR

5.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları

5.1.1. Ferulik asit için Aseton: Su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması

5.1.1.1. Absorbans belirleme

Aseton: Su (1:1 h/h) karışımı içinde $5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda hazırlanmış olan FA çözeltilisinin 326.0 nm 'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil. 5.1.'de sunulmuştur.



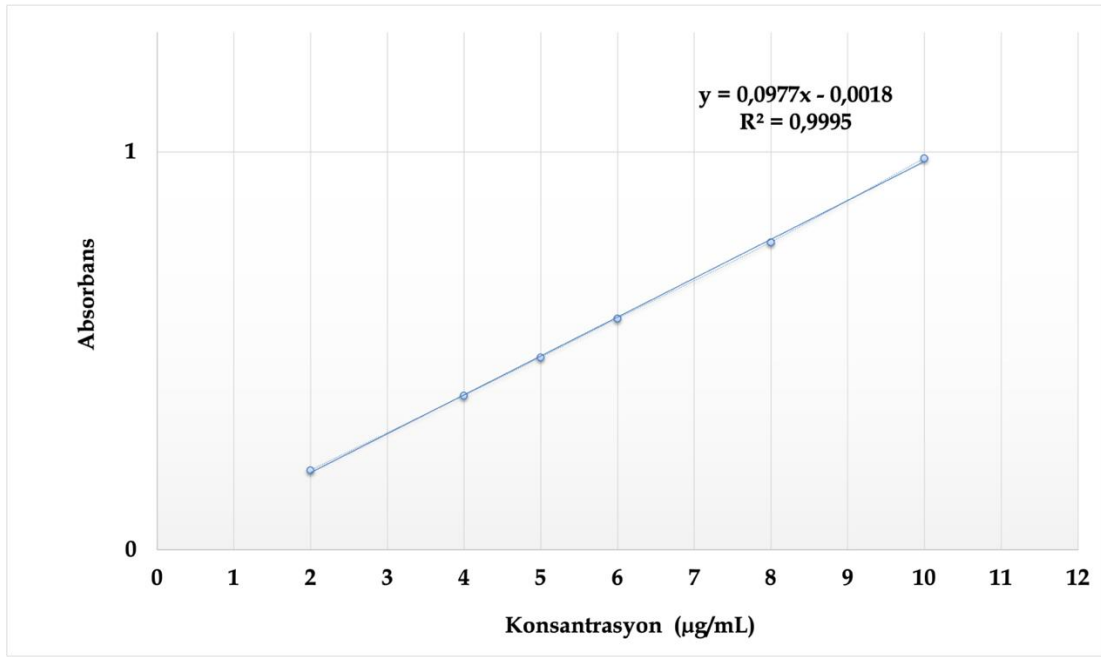
Şekil 5.1. Ferulik asit'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 326.0 \text{ nm}$)

5.1.1.2. Doğrusallık

Ferulik asit'in aseton: su (1:1 h/h) içinde $2.0-10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonları aralığında altı farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 326.0 nm 'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 5.1.'de verilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Yöntem doğrusallık sonuçları

FA (µg/mL)	Absorbans Değerleri					
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
2.0	0.197	0.200	0.203	0.200	0.00	0.00
4.0	0.393	0.380	0.391	0.388	0.01	0.00
5.0	0.479	0.479	0.493	0.484	0.01	0.00
6.0	0.575	0.577	0.592	0.581	0.01	0.00
8.0	0.769	0.765	0.786	0.773	0.01	0.00
10.0	0.988	0.980	0.984	0.984	0.00	0.00



Şekil 5.2. Ferulik asit'in aseton: su (1:1 h/h) ortamında standart eğrisi

5.1.1.3. Kesinlik

Ferulik asit için $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar analizi, 3 gün artarda yapılmıştır. Sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği analiz edilmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 5.2., Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 5.2. $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

4.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.388	0.391	0.388
	0.386	0.393	0.390
	0.394	0.385	0.389
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	3.988	4.019	3.988
	3.967	4.039	4.008
	4.049	3.957	3.998
Ortalama	4.002	4.005	3.998
Standart sapma (SS)	0.043	0.043	0.010
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	1.064	1.063	0.256
%95 Güven Aralığı	0.106	0.106	0.025

Tablo 5.3. 6.0 µg.mL-1 derişim için kesinlik sonuçları

6.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.584	0.585	0.590
	0.584	0.586	0.587
	0.585	0.584	0.591
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	5.993	6.003	6.054
	5.993	6.014	6.024
	6.003	5.993	6.065
Ortalama	5.996	6.003	6.048
Standart sapma (SS)	0.006	0.010	0.021
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.098	0.170	0.352
%95 Güven Aralığı	0.015	0.025	0.053

Tablo 5.4. 8.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

8.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.778	0.782	0.777
	0.782	0.779	0.778
	0.781	0.781	0.786
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	7.978	8.019	7.967
	8.019	7.988	7.978
	8.008	8.008	8.060
Ortalama	8.002	8.005	8.002
Standart sapma	0.021	0.016	0.050
Varyasyon Katsayısı	0.266	0.195	0.631
%95 Güven Aralığı	0.053	0.039	0.125

5.1.1.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (4.0 µg.mL⁻¹, 6.0 µg.mL⁻¹, 8.0 µg.mL⁻¹) ferulik asit içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında 'y=0.0977 - 0.0018' olarak elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır. Ardından yöntemin doğruluğu '% geri kazanım' olarak hesaplanmıştır. Ferulik asit için doğruluk çalışması sonuçları Tablo 5.5.'te verilmiştir.

Tablo 5.5. Yöntemin doğruluk sonuçları

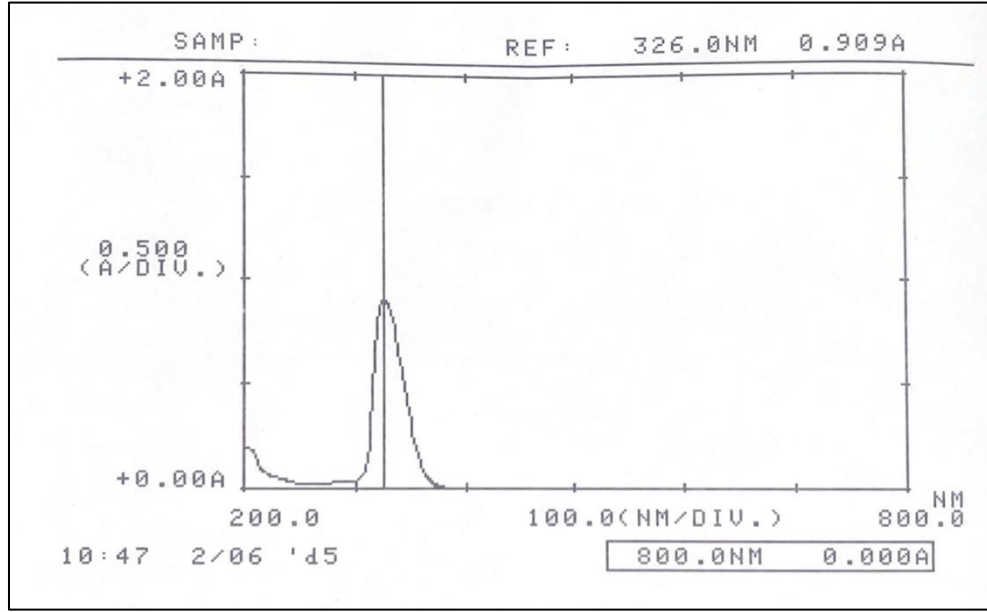
	Derişim		
	4.0 µg.mL ⁻¹	6.0 µg.mL ⁻¹	8.0 µg.mL ⁻¹
Elde edilen absorbanslar	0.387	0.583	0.776
	0.389	0.584	0.779
	0.391	0.585	0.784
Bulunan Derişimler	3.978	5.983	7.957
	3.998	5.993	7.988
	4.019	6.003	8.039
% Geri Kazanım	99.442	99.714	99.466
	99.953	99.884	99.850
	100.465	100.055	100.489
Ortalama Geri Kazanım (%)	99.953	99.884	99.935
Standart sapma (SS)	0.512	0.171	0.517
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.512	0.171	0.517
%95 Güven Aralığı	1.271	0.424	1.284

5.1.1.5. Duyarlılık

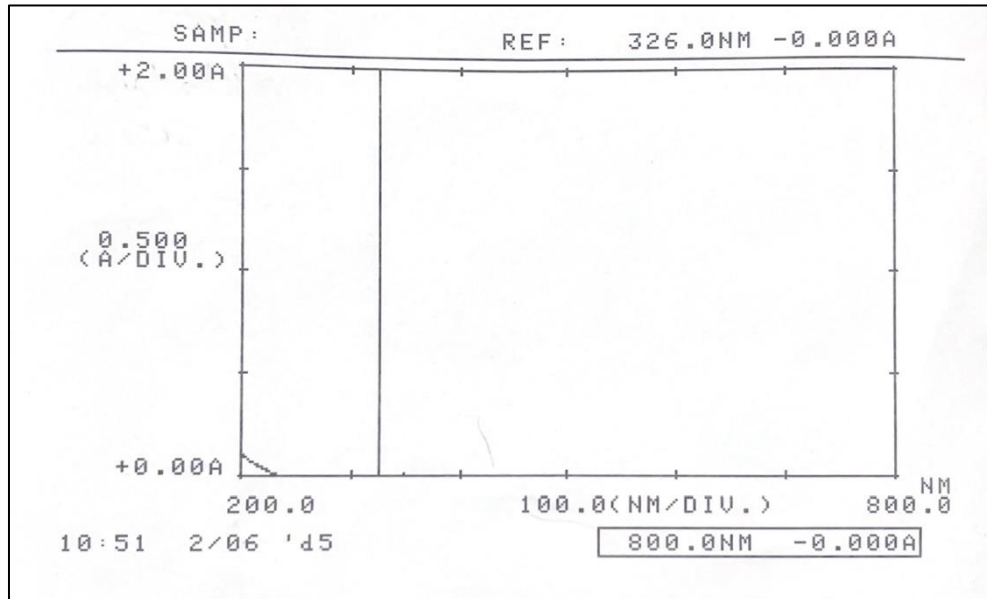
LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.226 µg.mL⁻¹ ve 0.685 µg.mL⁻¹ olarak elde edilmiştir.

5.1.1.6. Seçicilik

Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar ferulik asit ve A-Blank (Blank formülasyon) için sırasıyla Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 5.3. Ferulik asit'e ait spektrum

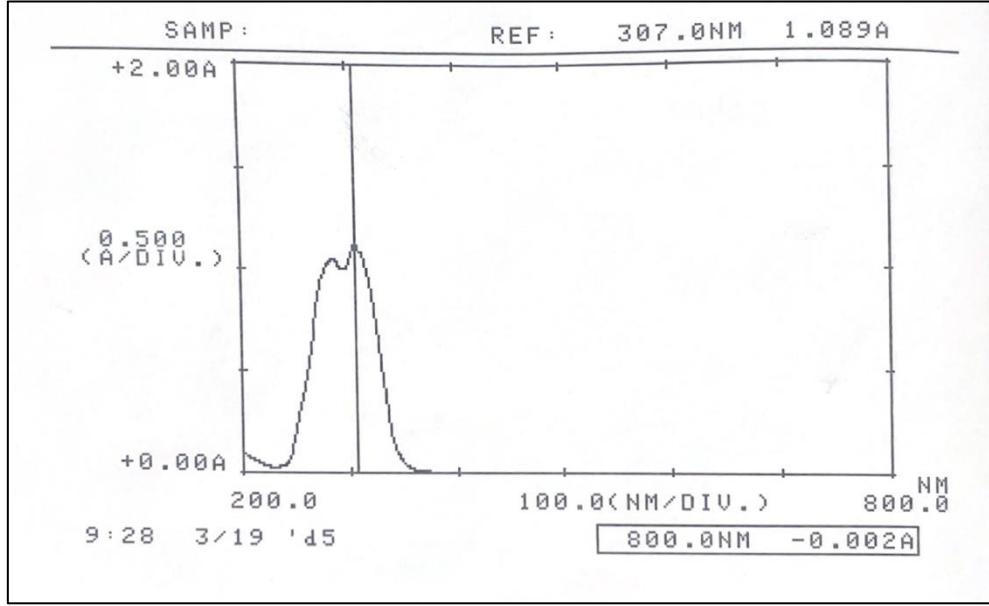


Şekil 5.4. A-Blank kodlu formülasyona ait spektrum

5.1.2. Ferulik asit için % 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması

5.1.2.1. Absorbans belirleme

% 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.5 ortamı içinde $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda hazırlanmış olan ferulik asit çözeltisinin 307.0 nm 'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil. 5.5.'de gösterilmiştir.



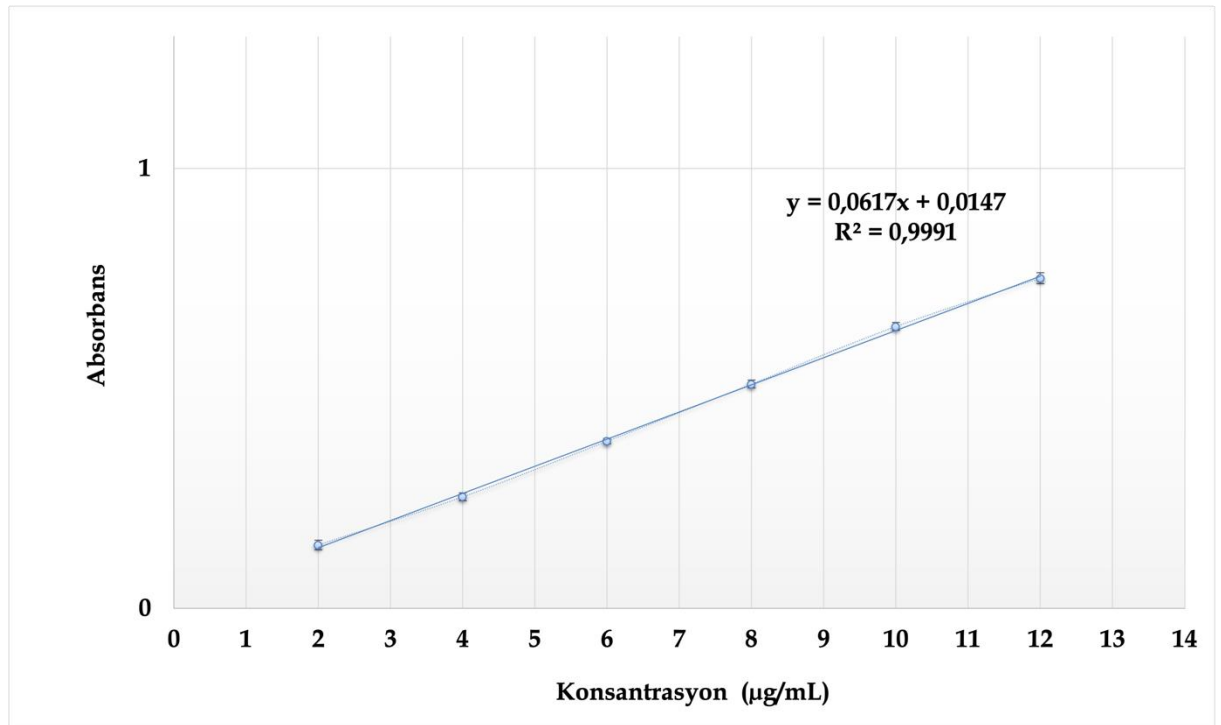
Şekil 5.5. Ferulik asit'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 307.0 \text{ nm}$)

5.1.2.2. Doğrusallık

Ferulik asit'in %1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında $2.0 - 12.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonları aralığında altı farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre kullanılarak 307 nm 'de analiz edilmiş ve konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 5.6.'da sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) Şekil 5.6.'da sunulmuştur.

Tablo 5.6. Doğrusallık çalışması sonuçları

FA (µg/mL)	Absorbans Değerleri					
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
2.0	0.114	0.161	0.159	0.145	0.03	0.01
4.0	0.228	0.265	0.269	0.254	0.02	0.01
6.0	0.363	0.387	0.391	0.380	0.02	0.01
8.0	0.488	0.512	0.531	0.510	0.02	0.01
10.0	0.616	0.654	0.653	0.641	0.02	0.01
12.0	0.716	0.769	0.767	0.751	0.03	0.01



Şekil 5.6. Ferulik asit'in %1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında standart eğrisi

5.1.2.3. Kesinlik

Ferulik asit için $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar analizi, 3 gün artarda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği

değerlendirilmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 5.7., Tablo 5.8. ve Tablo 5.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 5.7. $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

4.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.261	0.263	0.265
	0.264	0.262	0.260
	0.262	0.260	0.261
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	3.990	4.022	4.054
	4.038	4.006	3.973
	4.006	3.973	3.990
Ortalama	4.011	4.000	4.006
Standart sapma (SS)	0.025	0.025	0.043
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.617	0.619	1.070
%95 Güven Aralığı	0.061	0.061	0.106

Tablo 5.8. 6.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

6.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.387	0.386	0.379
	0.385	0.384	0.389
	0.384	0.379	0.385
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	6.031	6.015	5.901
	5.998	5.982	6.063
	5.982	5.901	5.998
Ortalama	6.004	5.966	5.988
Standart sapma (SS)	0.025	0.058	0.082
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.412	0.979	1.362
%95 Güven Aralığı	0.061	0.145	0.203

Tablo 5.9. 8.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

8.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.508	0.509	0.506
	0.510	0.511	0.509
	0.507	0.507	0.505
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	7.991	8.007	7.958
	8.023	8.039	8.007
	7.975	7.975	7.942
Ortalama	7.996	8.007	7.969
Standart sapma (SS)	0.025	0.032	0.034
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.309	0.405	0.423
%95 Güven Aralığı	0.061	0.080	0.084

5.1.2.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (4.0 µg.mL⁻¹, 6.0 µg.mL⁻¹, 8.0 µg.mL⁻¹) ferulik asit içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında ‘ $y = 0.0617x + 0.0147$ ’ olarak elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. Ferulik asit için doğruluk çalışması sonuçları Tablo 5.10.’da verilmiştir.

Tablo 5.10. Yöntemin doğruluk sonuçları

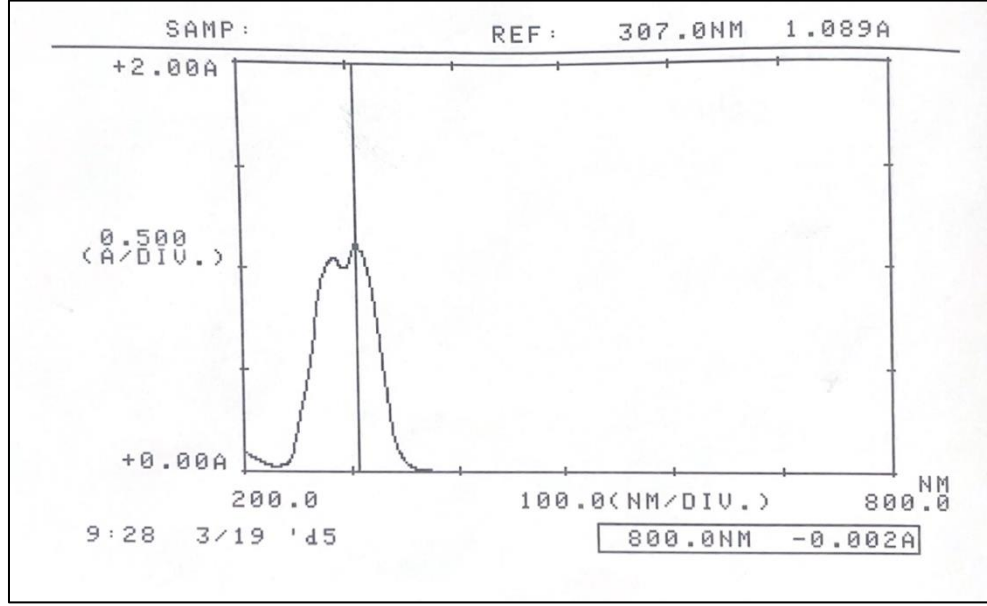
	Derişim		
	4.0 µg.mL ⁻¹	6.0 µg.mL ⁻¹	8.0 µg.mL ⁻¹
Elde edilen absorbanslar	0.262	0.387	0.509
	0.261	0.384	0.506
	0.262	0.385	0.511
Bulunan Derişimler	4.006	6.031	8.007
	3.990	5.982	7.958
	4.006	5.998	8.039
% Geri Kazanım	100.143	100.512	100.089
	99.738	99.702	99.481
	100.143	99.972	100.494
Ortalama % Geri Kazanım	100.008	100.062	100.021
Standart sapma	0.234	0.412	0.510
Varyasyon Katsayısı	0.234	0.412	0.510
%95 Güven Aralığı	0.581	1.025	1.266

5.1.2.5. Duyarlılık

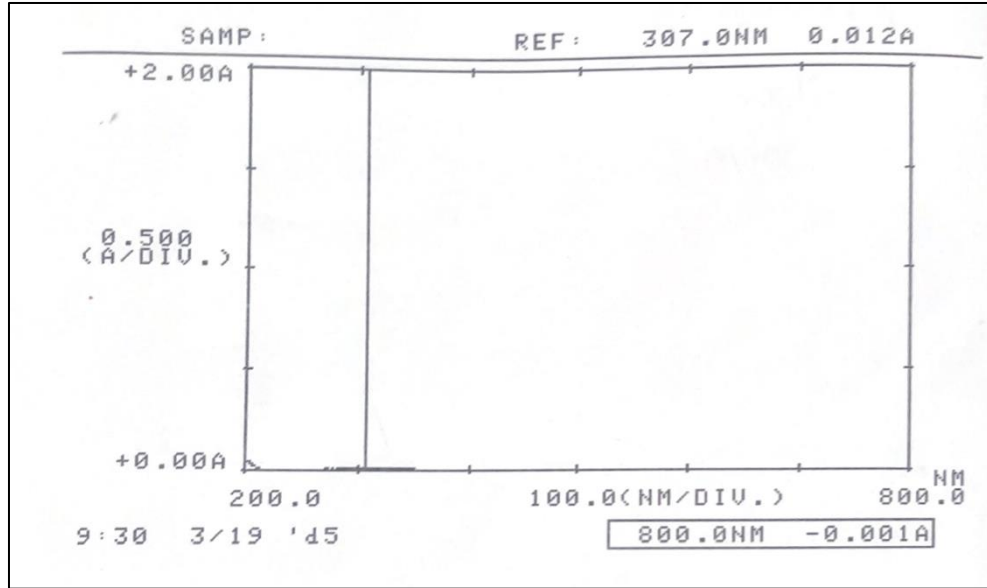
LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.377 µg.mL⁻¹ ve 1.144 µg.mL⁻¹ olarak elde edilmiştir.

5.1.2.6. Seçicilik

Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar ferulik asit ve A-Blank (Blank formülasyon) için sırasıyla Şekil 5.7. ve Şekil 5.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.7. Ferulik asit'e ait spektrum



Şekil 5.8. A-Blank kodlu formülasyona ait spektrum

5.2. Blank nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

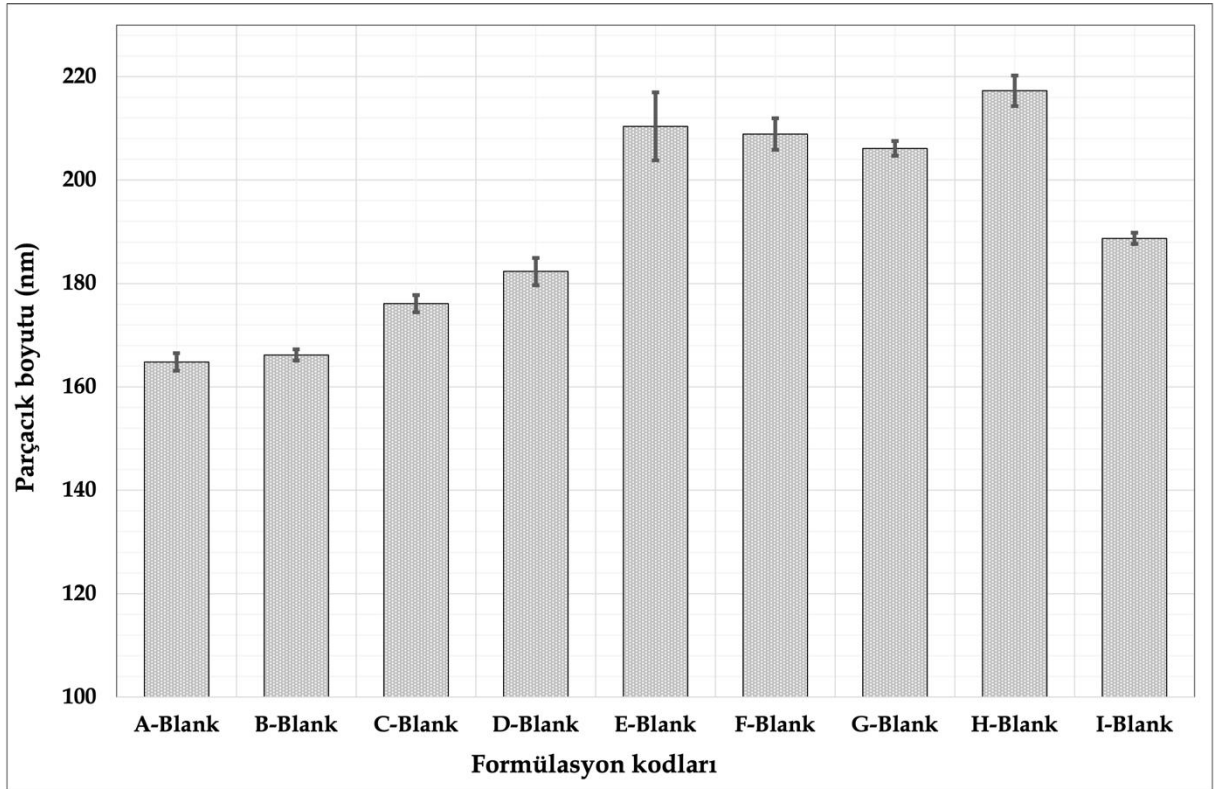
5.2.1. Blank formülasyonların parçacık boyut analizi

Formülasyon ön deneme çalışmalarında hazırlanan tüm blank nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyut sonuçları üç analiz verisi, ortalama ve standart sapma (SS) değerleriyle beraber Tablo 5.11.'de sunulmuştur. Daha net anlaşılabilmesi ve

karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Şekil 5.9.'da parçacık boyutu değerleri grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.11. *Blank formülasyonların parçacık boyut sonuçları*

Kod	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS
A-Blank	162.9	165.7	165.9	164.83	1.68
B-Blank	165.4	165.7	167.4	166.17	1.08
C-Blank	174.2	176.2	177.4	176.10	1.68
D-Blank	179.3	183.6	184.1	182.33	2.64
E-Blank	205.3	208.1	217.8	210.40	6.56
F-Blank	206.4	208.0	212.3	208.9	3.05
G-Blank	204.5	206.7	207.2	206.13	1.44
H-Blank	214.7	216.7	220.5	217.3	2.95
I-Blank	187.5	189.2	189.5	188.73	1.08



Şekil 5.9. *Blank formülasyonların parçacık boyut değerleri grafiği*

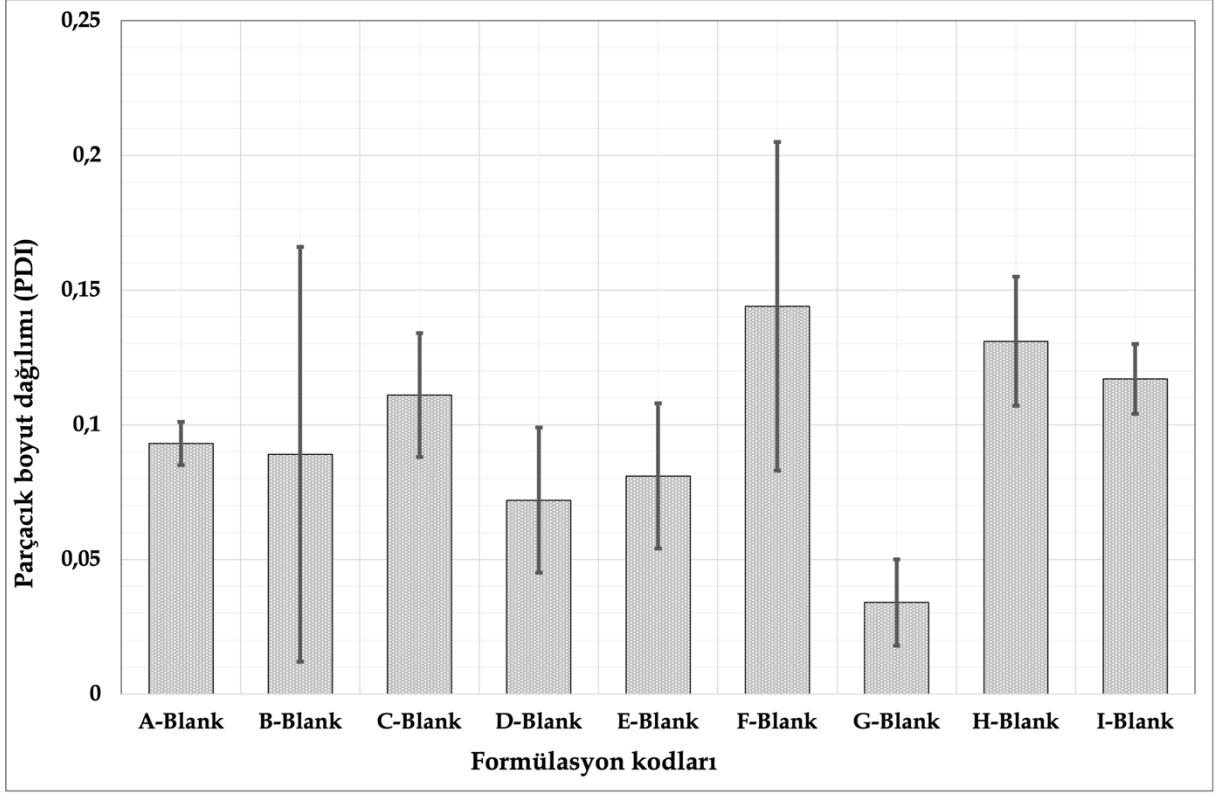
5.2.2. Blank formülasyonların parçacık boyut dağılım (PDI) analizi

Formülasyon ön deneme çalışmalarında hazırlanan tüm blank nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyut dağılım (PDI) sonuçları üç analiz verisi, ortalama ve standart sapma (SS) değerleriyle beraber Tablo 5.12.'de sunulmuştur. Daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Şekil 5.10.'da parçacık boyut dağılım (PDI) değerleri grafik olarak verilmiştir.

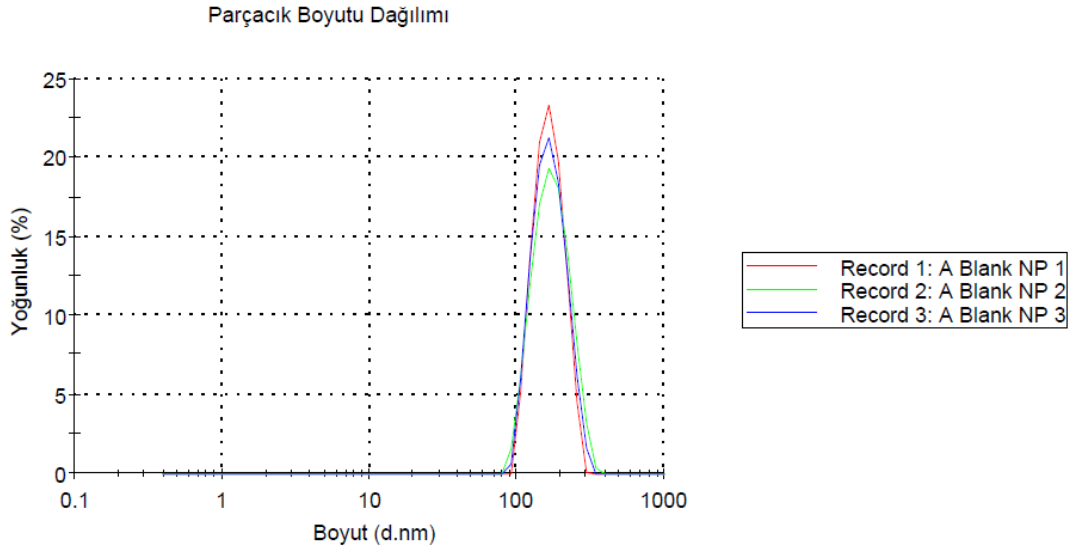
Zetasizer Nano ZS cihazından alınan parçacık boyut dağılım raporları ise A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.11., Şekil 5.12., Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18. ve Şekil 5.19.'da verilmiştir.

Tablo 5.12. *Blank formülasyonların parçacık boyut dağılım (PDI) sonuçları*

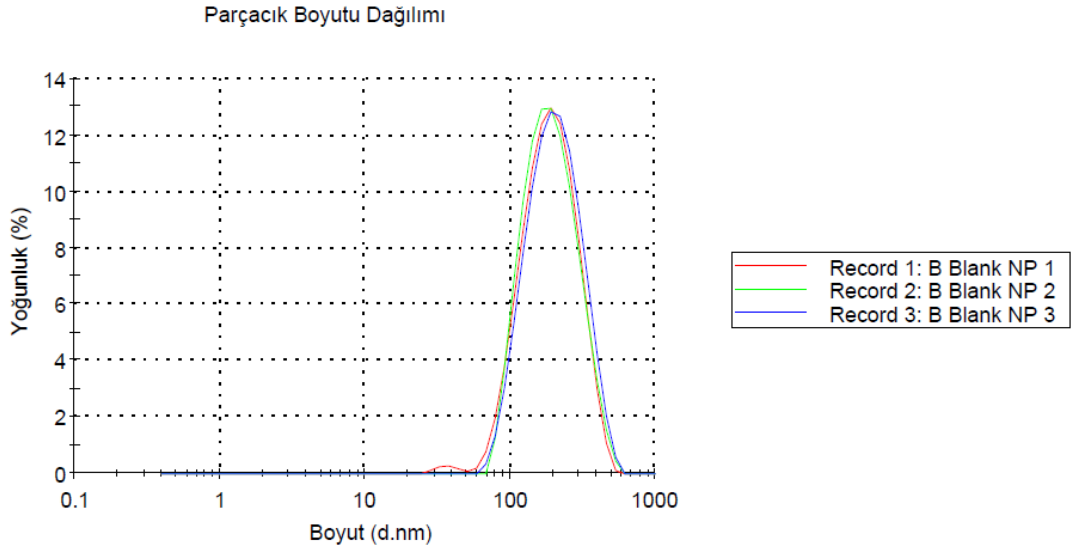
Kod	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS
A-Blank	0.080	0.087	0.099	0.093	0.008
B-Blank	0.002	0.120	0.146	0.089	0.077
C-Blank	0.085	0.120	0.127	0.111	0.023
D-Blank	0.042	0.079	0.094	0.072	0.027
E-Blank	0.058	0.075	0.110	0.081	0.027
F-Blank	0.102	0.116	0.214	0.144	0.061
G-Blank	0.017	0.039	0.047	0.034	0.016
H-Blank	0.117	0.118	0.159	0.131	0.024
I-Blank	0.107	0.112	0.132	0.117	0.013



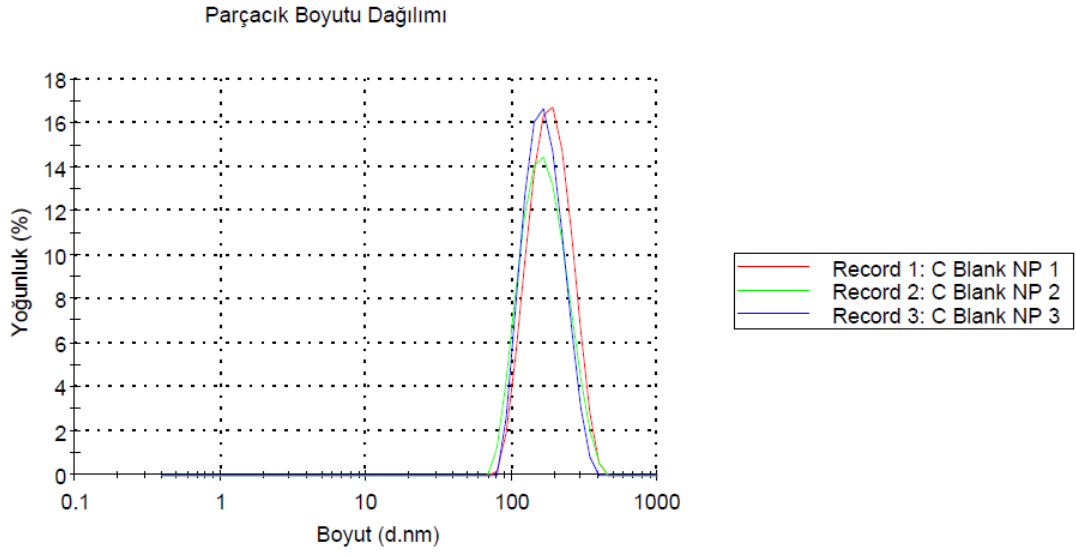
Şekil 5.10. Blank formülasyonların parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri grafiği



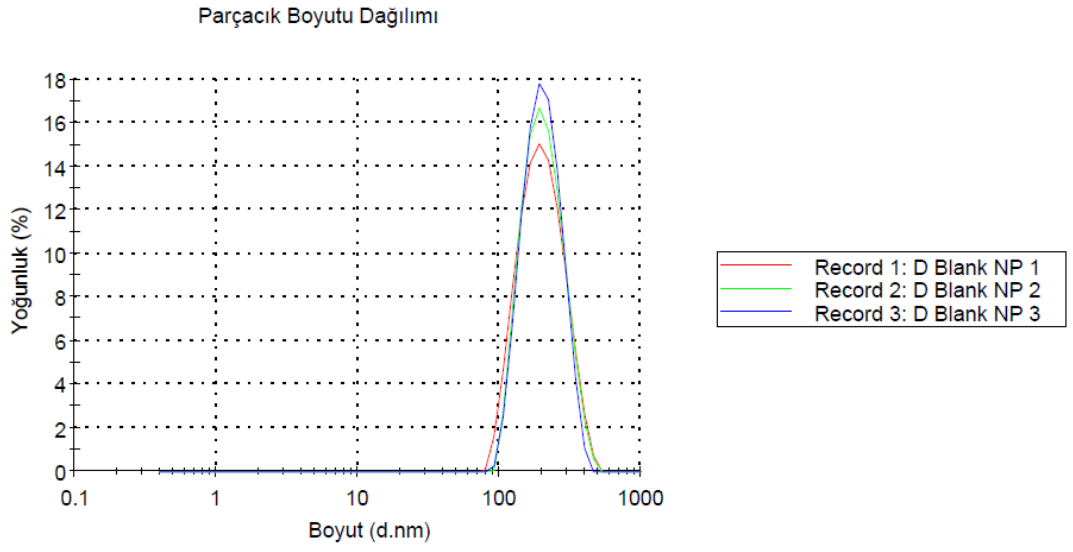
Şekil 5.11. A-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



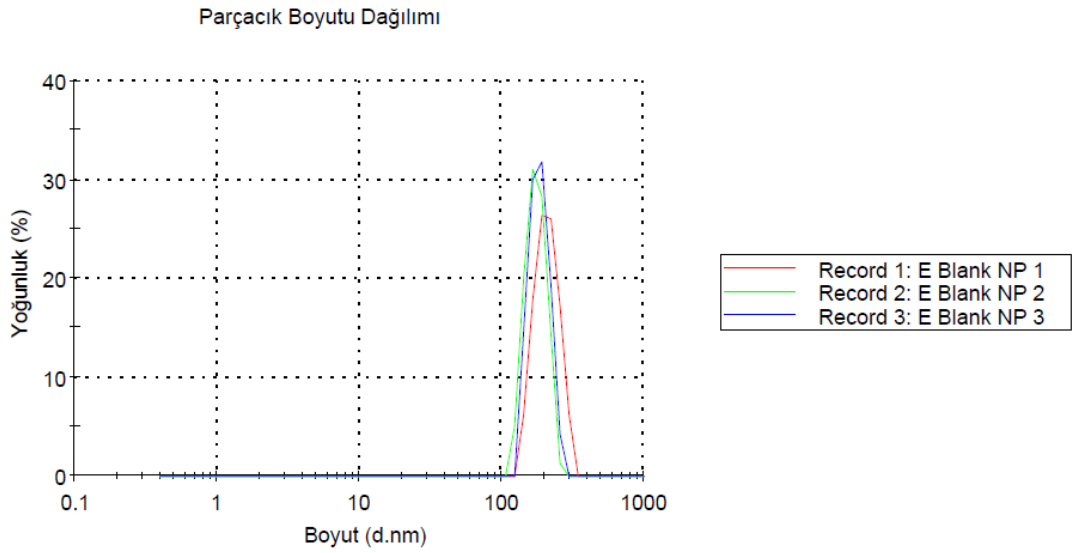
Şekil 5.12. B-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



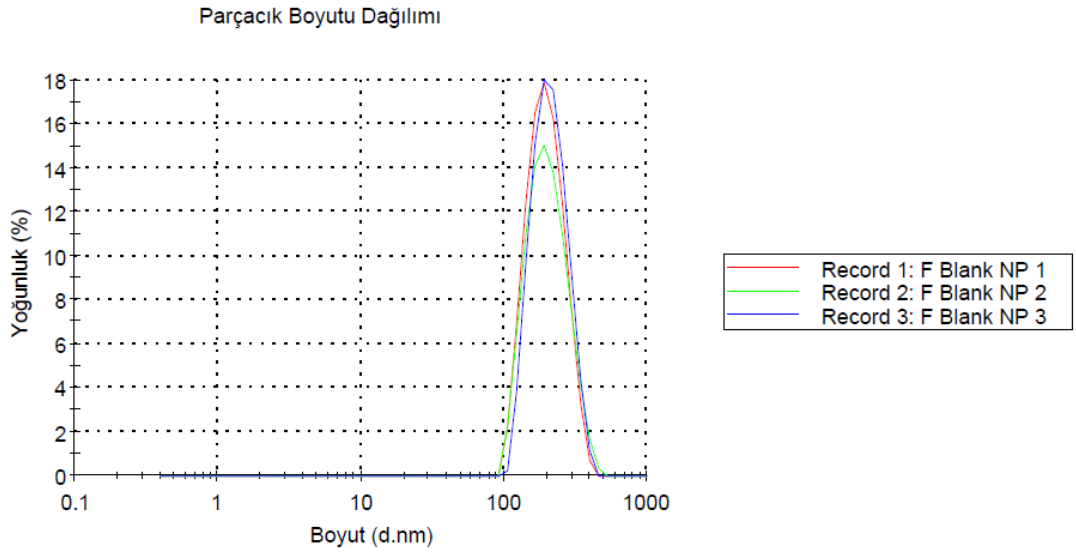
Şekil 5.13. C-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



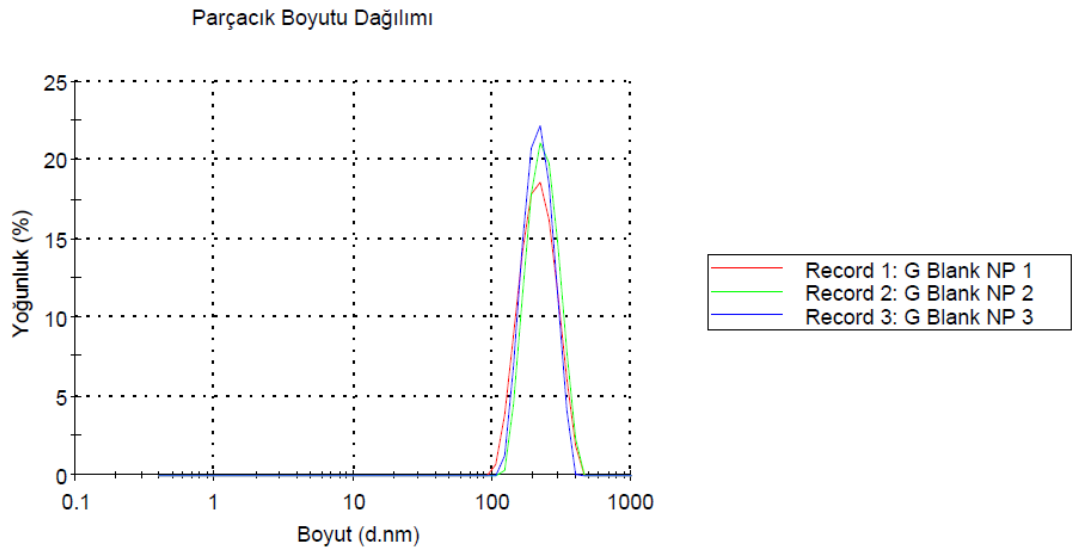
Şekil 5.14. D-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



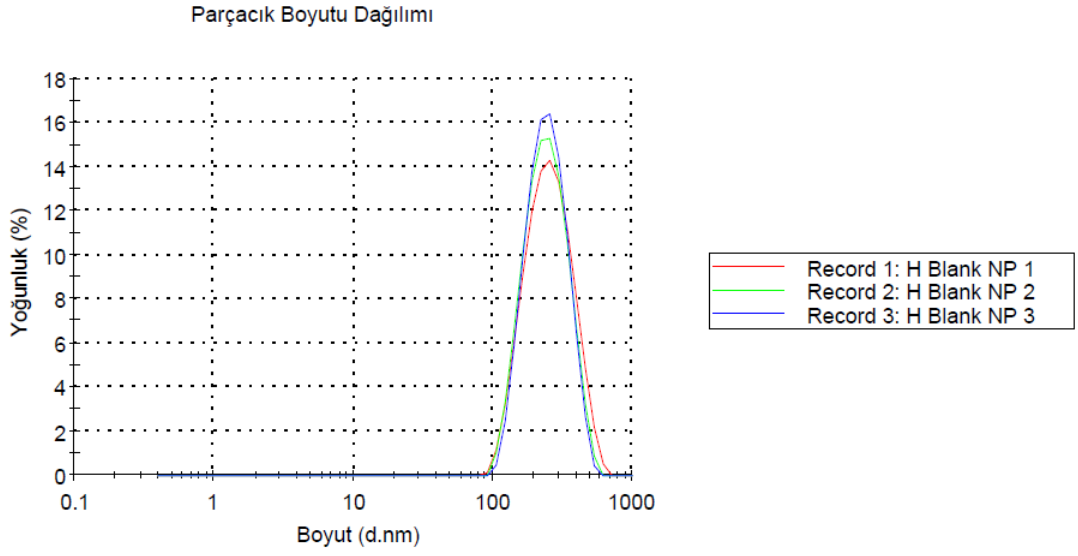
Şekil 5.15. E-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



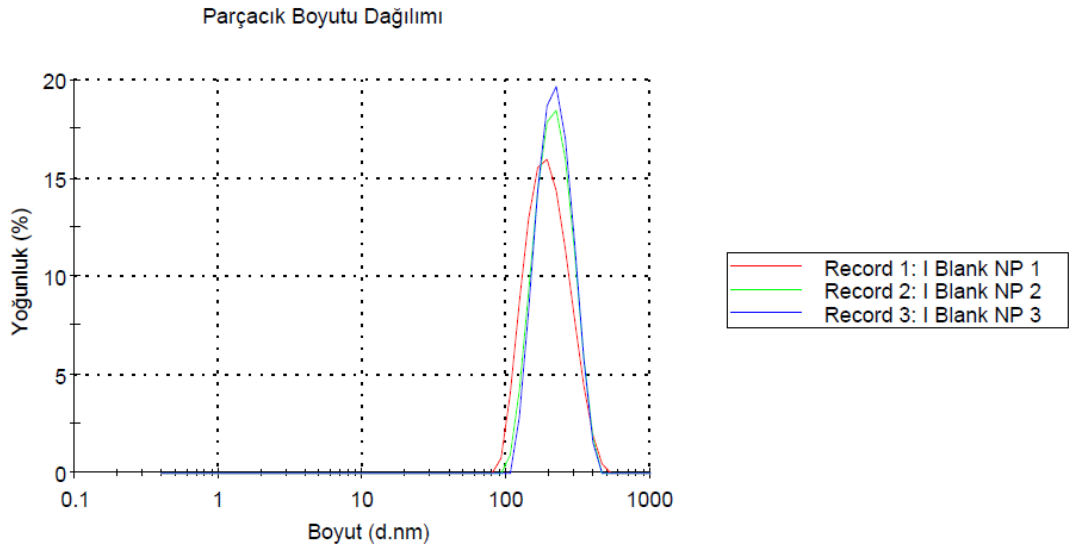
Şekil 5.16. F-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



Şekil 5.17. G-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



Şekil 5.18. H-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



Şekil 5.19. I-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu

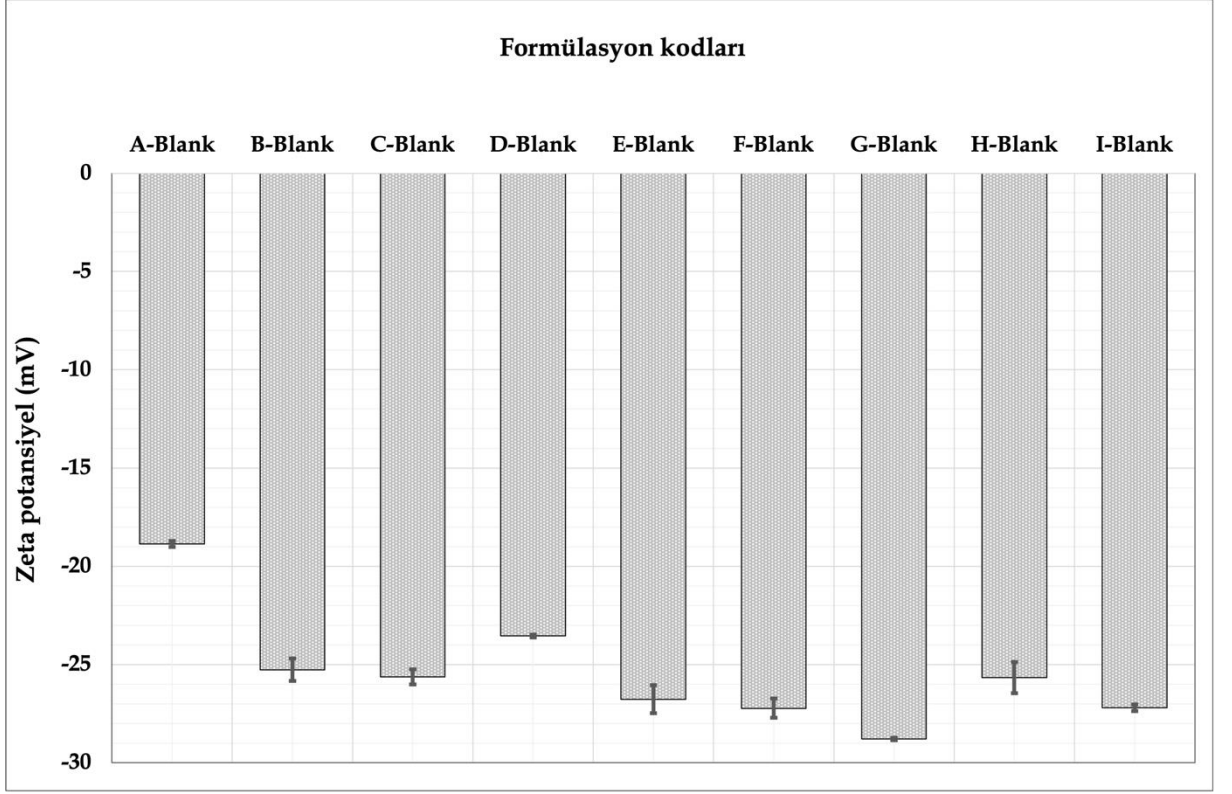
5.2.3. Blank formülasyonların zeta potansiyel analizi

Formülasyon ön deneme çalışmalarında hazırlanan tüm blank nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel sonuçları üç analiz verisi, ortalama ve standart sapma (SS) değerleriyle beraber Tablo 5.13.'de sunulmuştur. Elde edilen değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi için Şekil 5.20.'de zeta potansiyel verileri grafik halinde gösterilmiştir.

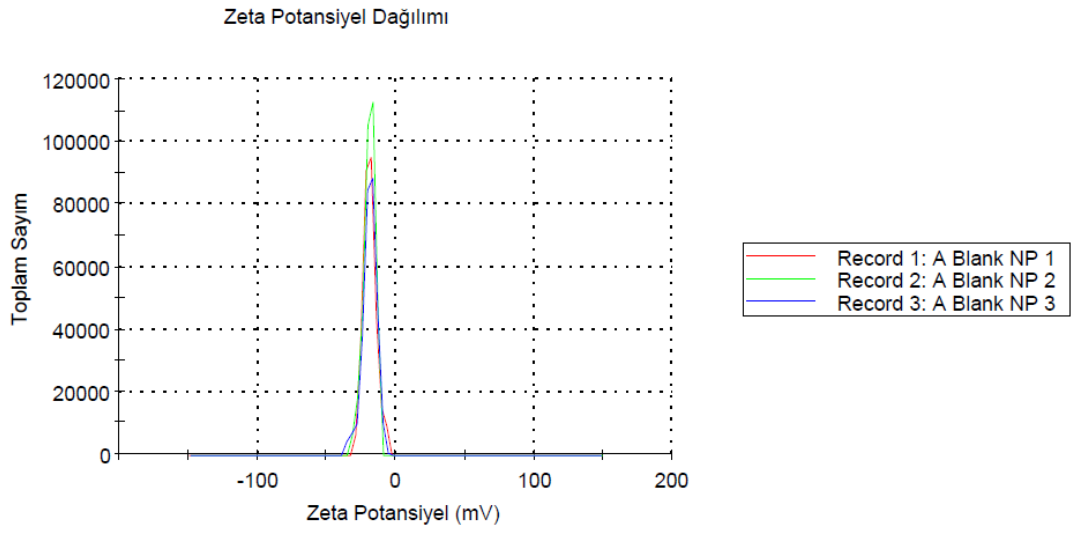
Zetasizer Nano ZS cihazından alınan zeta potansiyel raporları ise A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.21., Şekil 5.22., Şekil 5.23., Şekil 5.24., Şekil 5.25., Şekil 5.26., Şekil 5.27., Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.'da sunulmuştur.

Tablo 5.13. *Blank formülasyonların zeta potansiyel sonuçları*

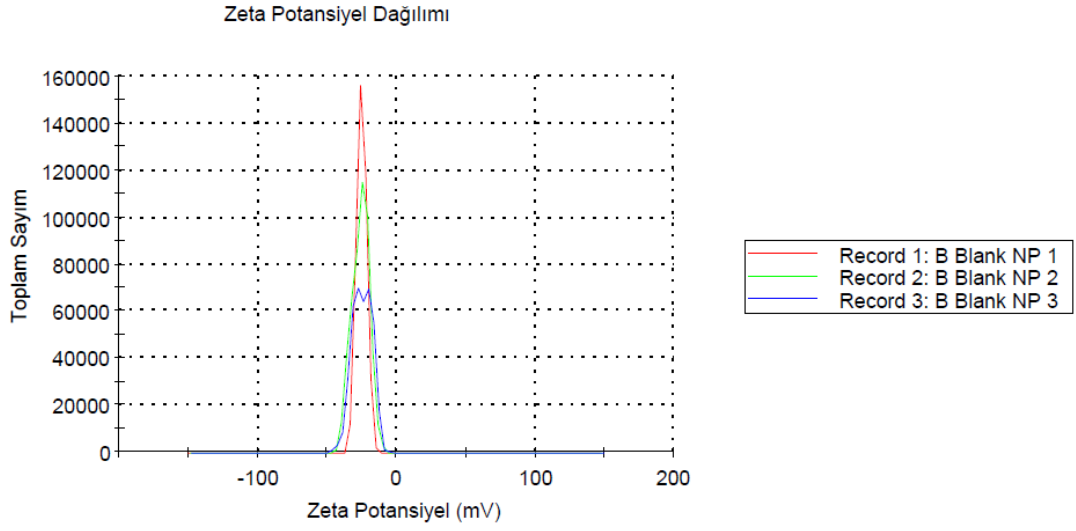
Kod	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS
A-Blank	-19.0	-18.9	-18.7	-18.87	0.15
B-Blank	-25.9	-25.1	-24.8	-25.27	0.57
C-Blank	-25.9	-25.8	-25.2	-25.63	0.38
D-Blank	-24.0	-23.6	-23.5	-23.55	0.07
E-Blank	-27.6	-26.4	-26.3	-26.77	0.72
F-Blank	-27.8	-27.0	-26.9	-27.23	0.49
G-Blank	-28.8	-28.8	-28.7	-28.8	0.06
H-Blank	-26.5	-25.6	-24.9	-25.67	0.80
I-Blank	-27.4	-27.1	-27.1	-27.2	0.17



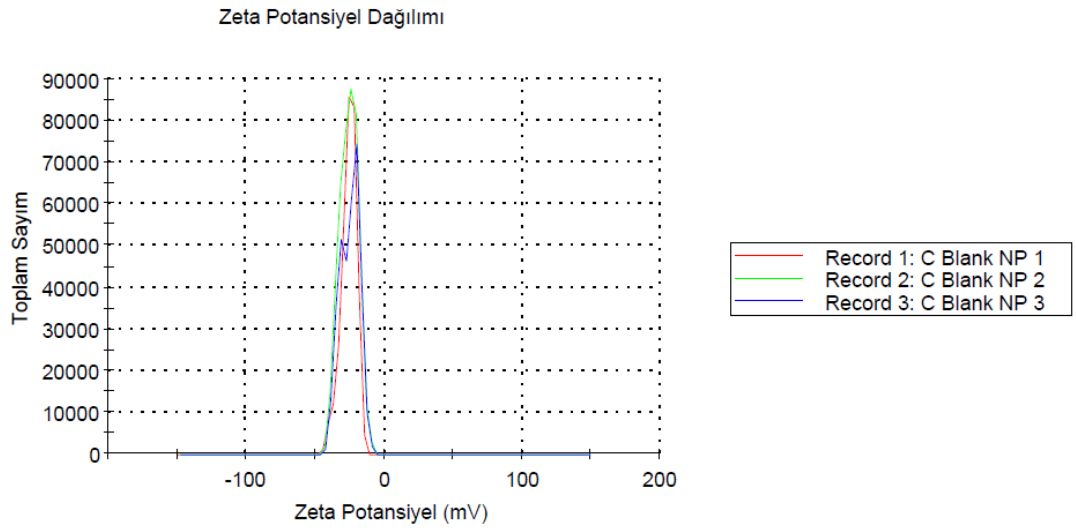
Şekil 5.20. Blank formülasyonların zeta potansiyel değerleri grafiği



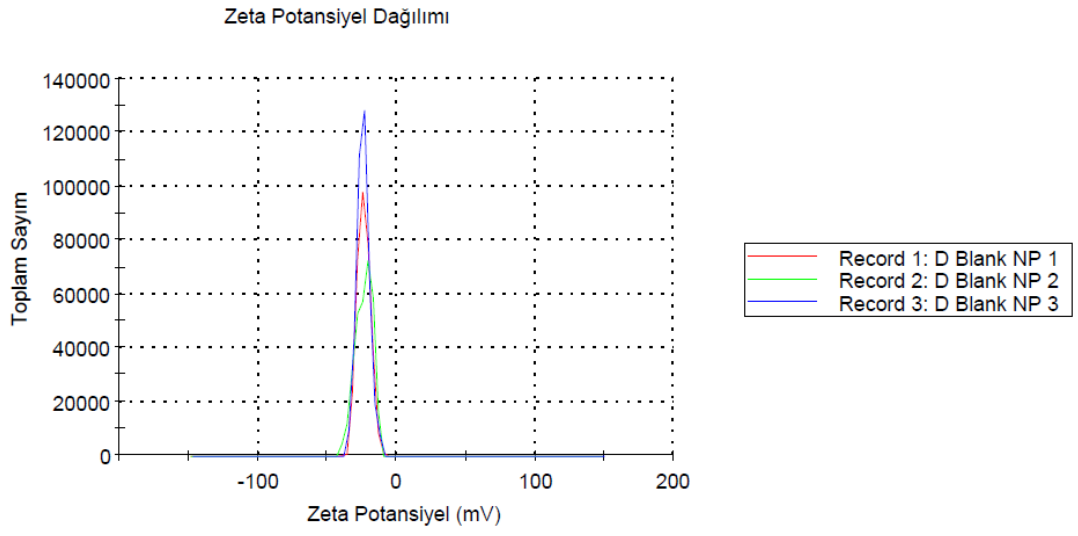
Şekil 5.21. A-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



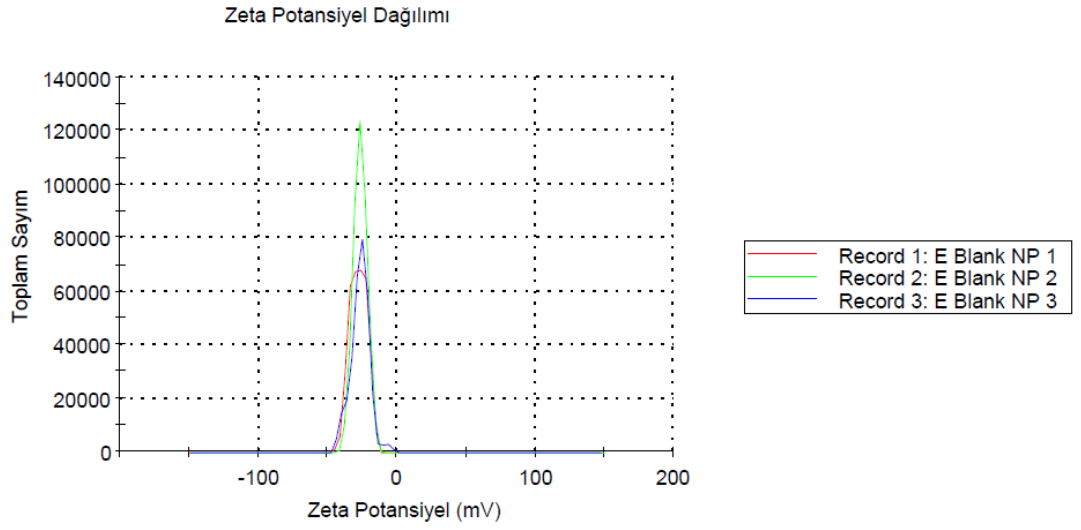
Şekil 5.22. B-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



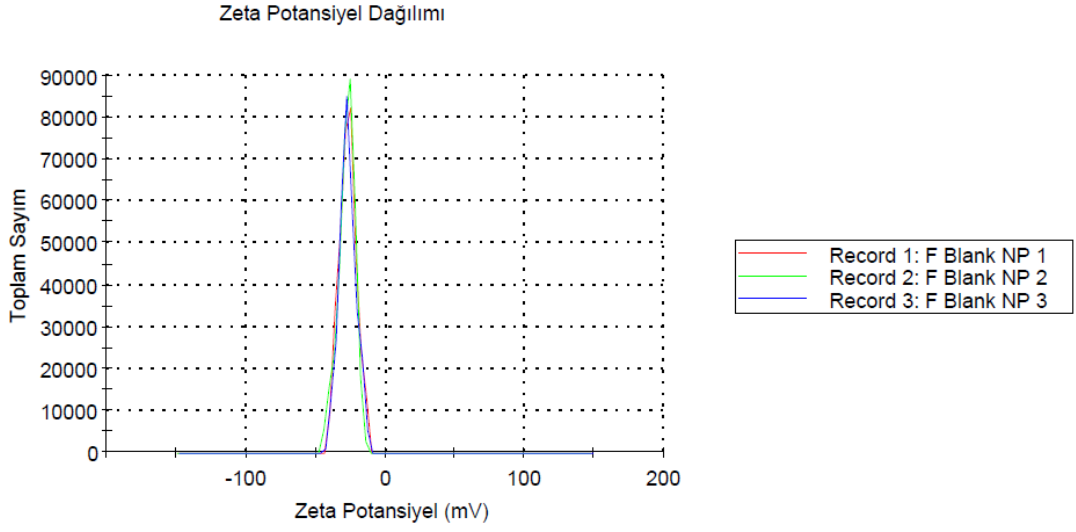
Şekil 5.23. C-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



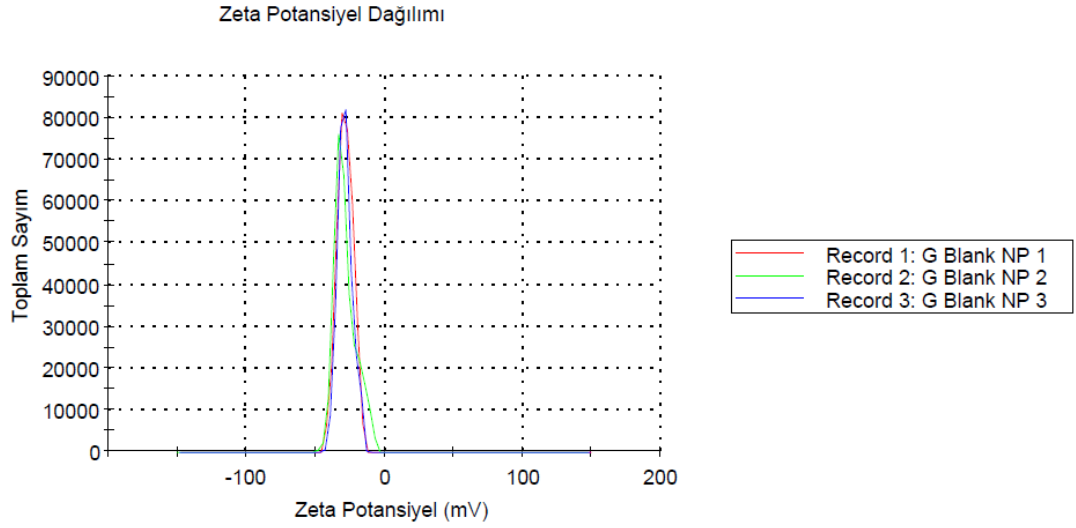
Şekil 5.24. D-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



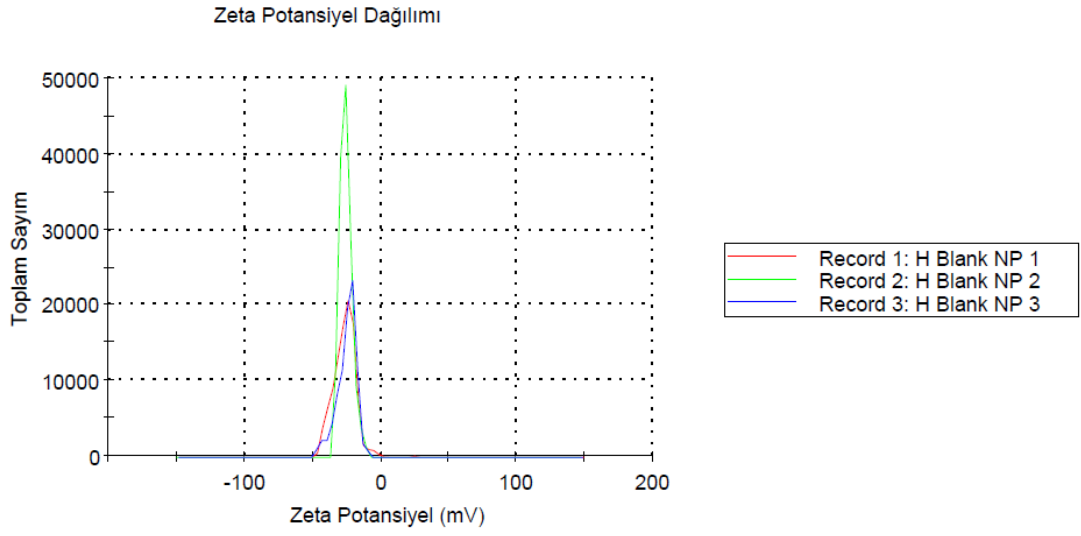
Şekil 5.25. E-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



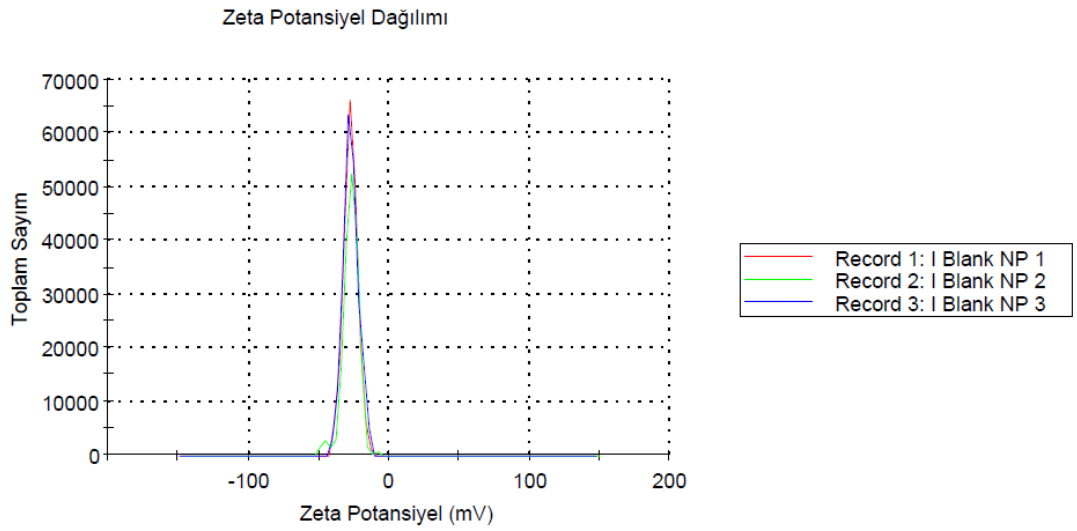
Şekil 5.26. *F-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu*



Şekil 5.27. *G-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu*



Şekil 5.28. *H-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu*



Şekil 5.29. *I-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu*

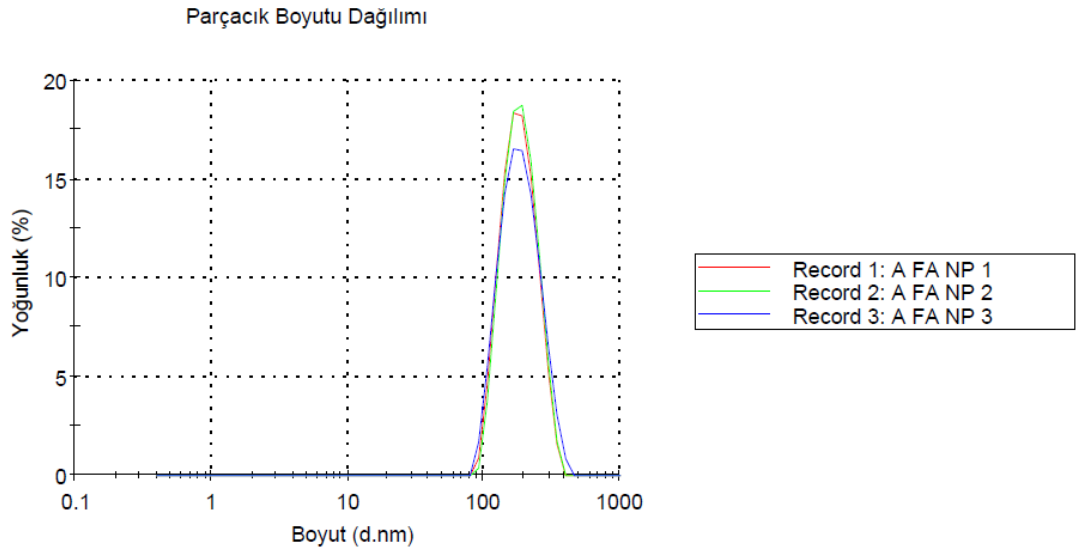
5.3. Ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonunun karakterizasyonu

Formülasyon ön deneme çalışmalarında hazırlanan farklı blank nanopartikül formülasyonlarının sonuçlarının ardından A-Blank formülasyonu optimum olarak seçilmiş ve ilgili formülasyon içeriğiyle ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel sonuçları üç analiz verisi, ortalama ve standart sapma (SS) değerleriyle beraber Tablo 5.14.'te verilmiştir. A-FA kodlu ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonu için Zetasizer Nano ZS cihazından

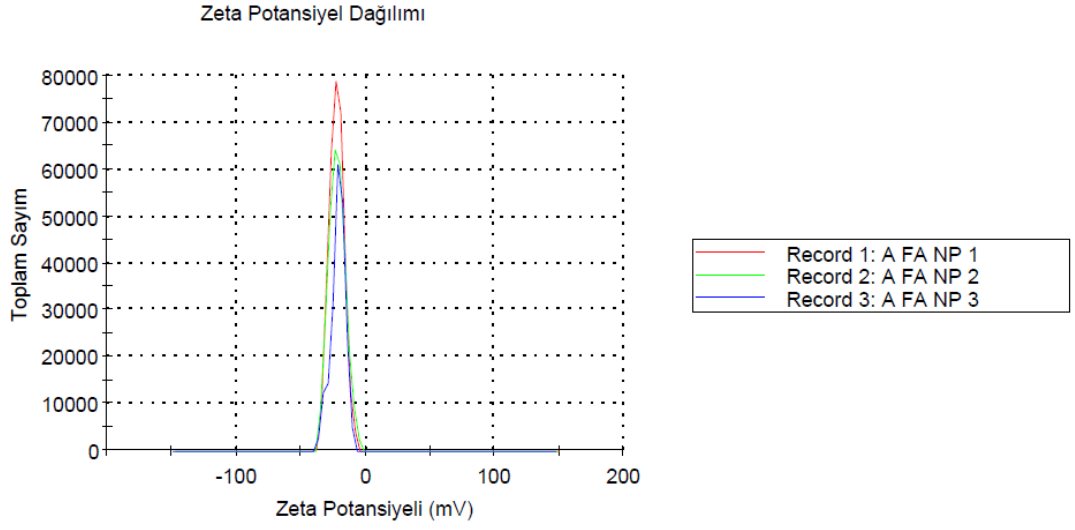
alınan parçacık boyut dağılım raporu ve zeta potansiyel raporu sırasıyla Şekil 5.30. ve Şekil 5.31.'de verilmiştir.

Tablo 5.14. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel sonuçları

Analiz türü	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS
Parçacık boyutu (nm)	174.0	174.4	175.7	174.70	0.89
Parçacık boyut dağılımı (PDI)	0.107	0.116	0.117	0.113	0.006
Zeta potansiyel (mV)	-22.50	-22.10	-21.40	-22.00	0.56



Şekil 5.30. A-FA için Zetasizer Nano ZS parçacık boyu dağılım raporu



Şekil 5.31. A-FA için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu

5.4. Dondurma ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) üzerinde trehaloz etkisi ve saklama koşulunun belirlenmesi

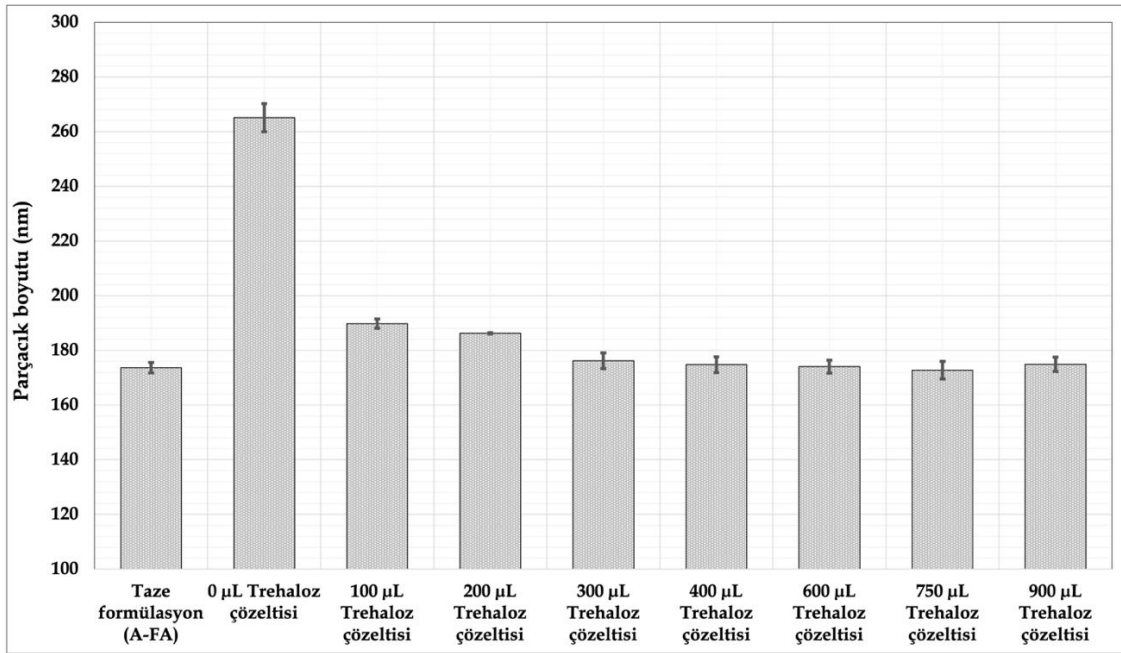
5.4.1. Dondurma işlemine etkisi trehaloz etkisi

5.4.1.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

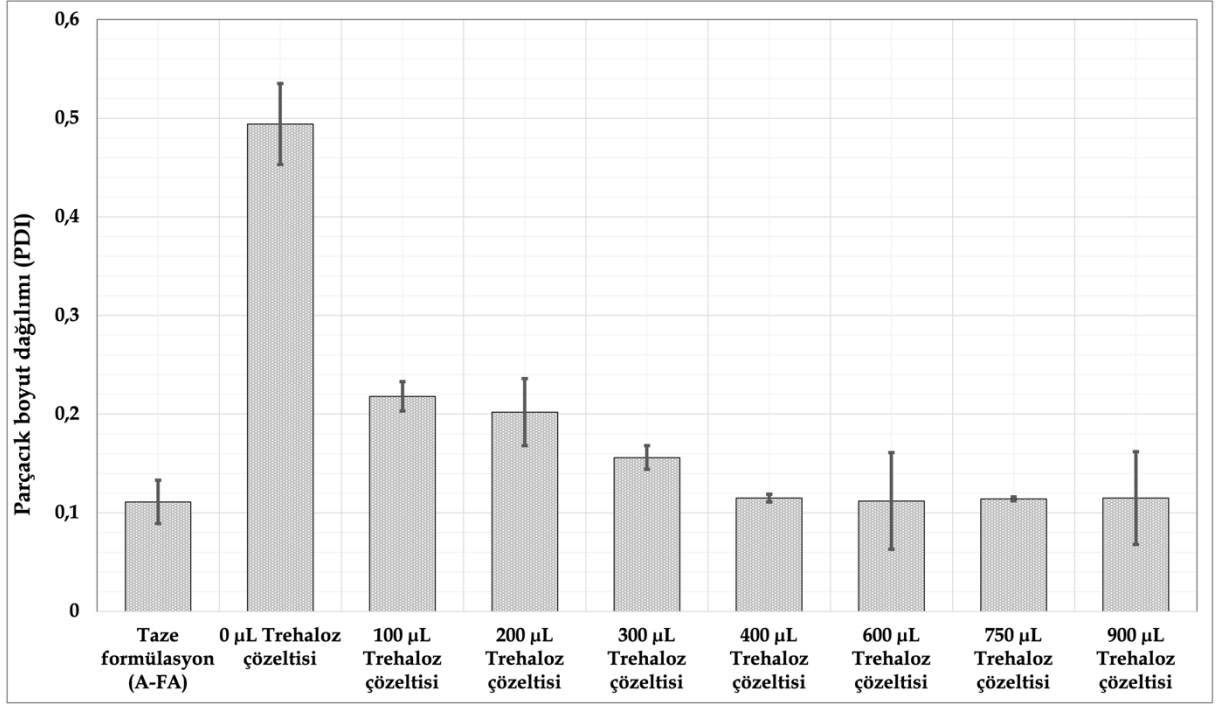
A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu için gerçekleştirilen dondurma üzerindeki kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen parçacık boyutu (nm) ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) sonuçları Tablo 5.15.'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçların karşılaştırma yapabilmek ve daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.32. ve Şekil 5.33.'te sırasıyla parçacık boyutu (nm) ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) sonuçları grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.15. Dondurma işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu (PDI) üzerindeki etkisi

	Parçacık Boyutu, nm (ortalama \pm standart sapma)	Parçacık Boyutu Dağılımı, PDI (ortalama \pm standart sapma)
Taze formülasyon	173.70 \pm 1.88	0.111 \pm 0.022
0 μ L Trehaloz çözeltisi	265.10 \pm 5.11	0.494 \pm 0.041
100 μ L Trehaloz çözeltisi	189.77 \pm 1.70	0.218 \pm 0.015
200 μ L Trehaloz çözeltisi	186.30 \pm 0.20	0.202 \pm 0.034
300 μ L Trehaloz çözeltisi	176.20 \pm 2.86	0.156 \pm 0.012
400 μ L Trehaloz çözeltisi	174.77 \pm 2.88	0.115 \pm 0.004
600 μ L Trehaloz çözeltisi	174.08 \pm 2.35	0.112 \pm 0.049
750 μ L Trehaloz çözeltisi	172.77 \pm 3.21	0.114 \pm 0.002
900 μ L Trehaloz çözeltisi	174.93 \pm 2.57	0.115 \pm 0.047



Şekil 5.32. Dondurma işleminin sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu üzerindeki etki grafiği



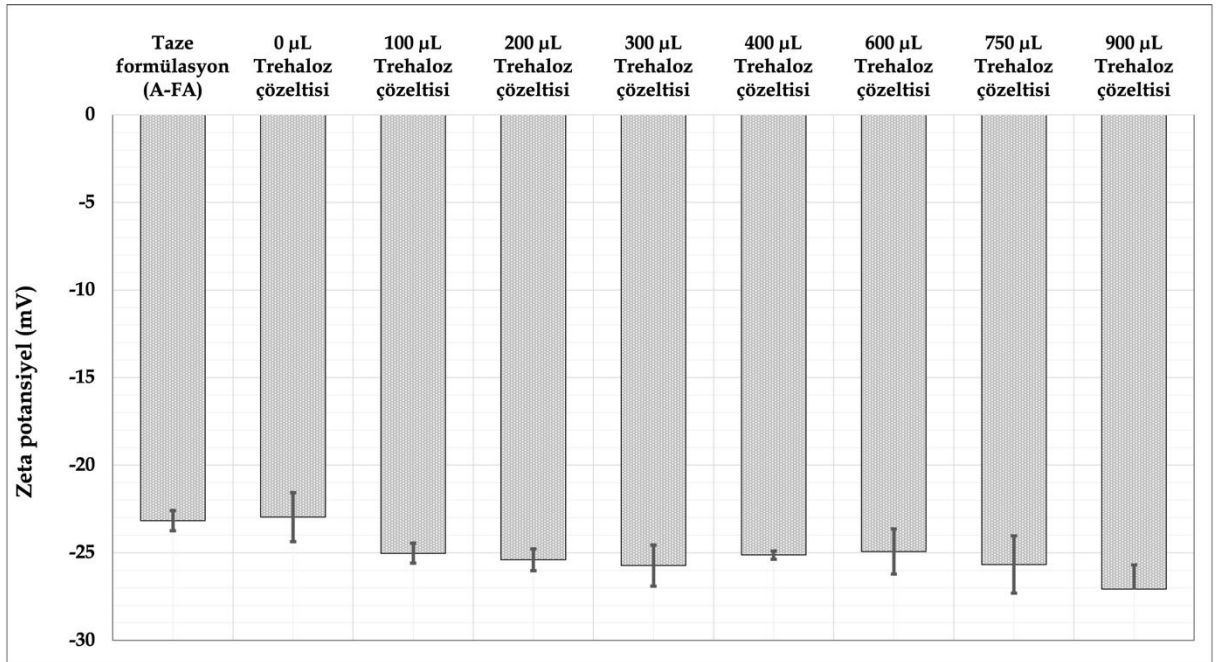
Şekil 5.33. Dondurma işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut dağılımı (PDI) üzerindeki etki grafiği

5.4.1.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu için gerçekleştirilen dondurma üzerindeki kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen zeta potansiyel sonuçları Tablo 5.16.'da sunulmuştur. Değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi için Şekil 5.34.'te zeta potansiyel sonuçları grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.16. Dondurma işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etkisi

	Zeta Potansiyel (mV, ortalama \pm standart sapma)
Taze formülasyon	-23.17 \pm 0.58
0 μ L Trehaloz çözeltisi	-22.97 \pm 1.40
100 μ L Trehaloz çözeltisi	-25.03 \pm 0.57
200 μ L Trehaloz çözeltisi	-25.40 \pm 0.62
300 μ L Trehaloz çözeltisi	-25.73 \pm 1.17
400 μ L Trehaloz çözeltisi	-25.13 \pm 0.23
600 μ L Trehaloz çözeltisi	-24.93 \pm 1.29
750 μ L Trehaloz çözeltisi	-25.67 \pm 1.64
900 μ L Trehaloz çözeltisi	-27.07 \pm 1.37



Şekil 5.34. Dondurma işleminin sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etki grafiği

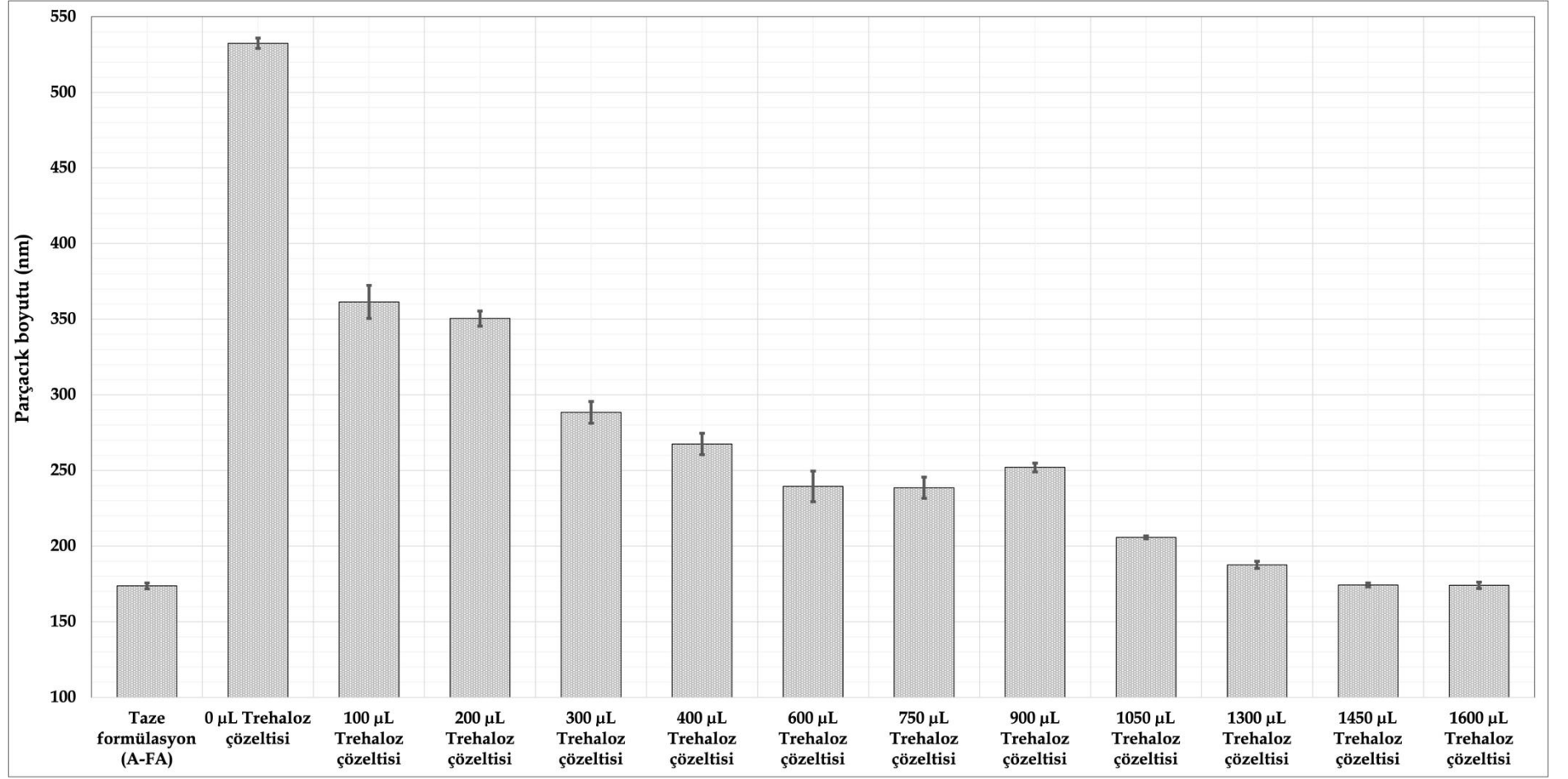
5.5. Liyofilizasyon işlemine trehaloz etkisi

5.5.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

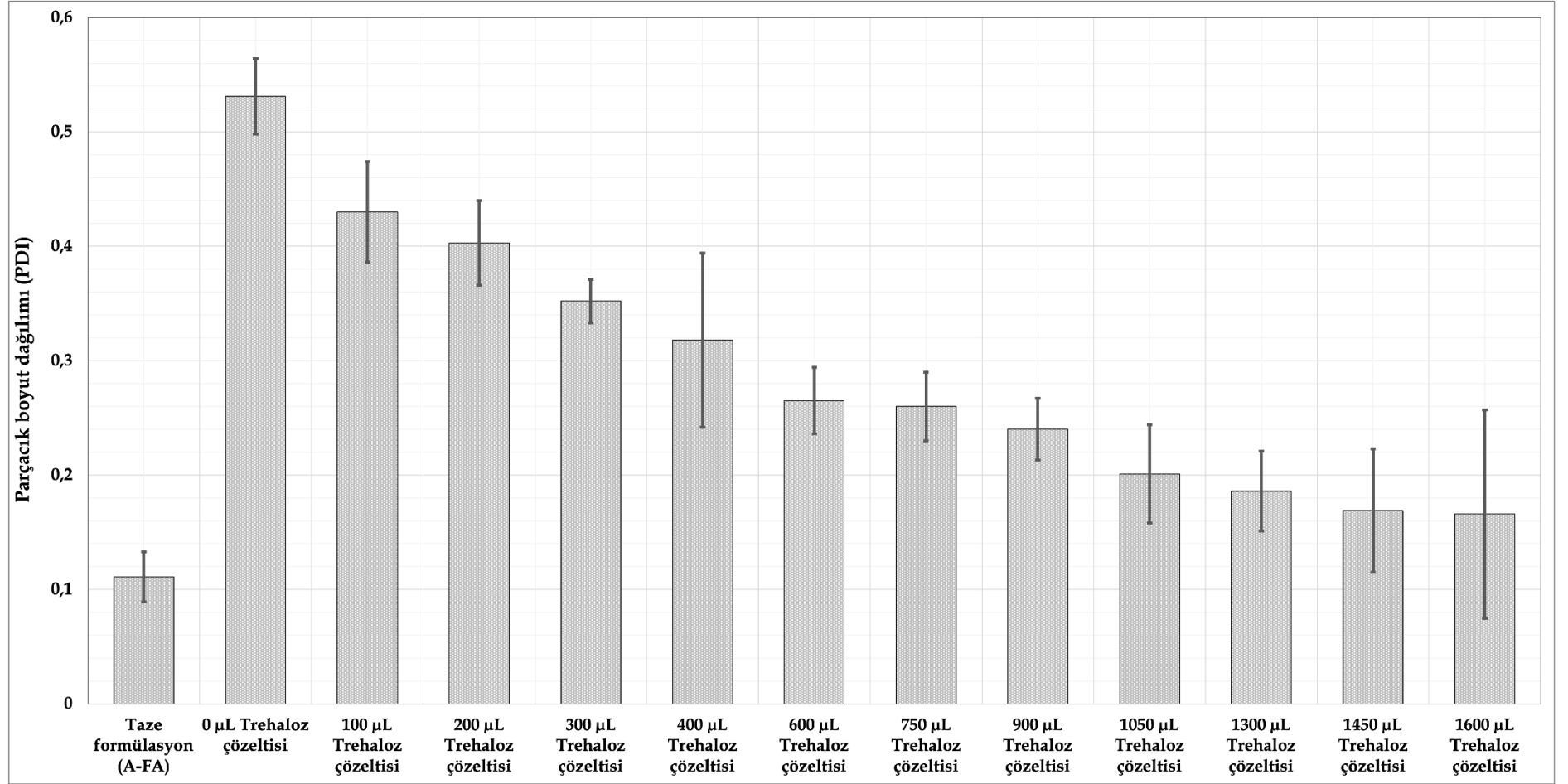
A-FA kodlu formülasyonu için gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemi üzerindeki kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen parçacık boyut ve parçacık boyutu (PDI) sonuçları Tablo 5.17.'de sunulmuştur. Değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırılabilmesi amacıyla Şekil 5.35. ve Şekil 5.36.'da sırasıyla parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) verileri grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.17. *Liyofilizasyon işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu (PDI) üzerindeki etkisi*

	Parçacık Boyutu (nm, ortalama \pm standart sapma)	Parçacık Boyutu Dağılımı (PDI, ortalama \pm standart sapma)
Taze formülasyon	173.70 \pm 1.88	0.111 \pm 0.022
0 μL Trehaloz çözeltisi	532.50 \pm 3.48	0.531 \pm 0.033
100 μL Trehaloz çözeltisi	361.47 \pm 10.89	0.430 \pm 0.044
200 μL Trehaloz çözeltisi	350.47 \pm 4.97	0.403 \pm 0.037
300 μL Trehaloz çözeltisi	288.43 \pm 7.21	0.352 \pm 0.019
400 μL Trehaloz çözeltisi	267.50 \pm 7.10	0.318 \pm 0.076
600 μL Trehaloz çözeltisi	239.47 \pm 10.20	0.265 \pm 0.029
750 μL Trehaloz çözeltisi	238.60 \pm 6.95	0.260 \pm 0.030
900 μL Trehaloz çözeltisi	252.03 \pm 2.86	0.240 \pm 0.027
1050 μL Trehaloz çözeltisi	205.80 \pm 0.97	0.201 \pm 0.043
1300 μL Trehaloz çözeltisi	187.62 \pm 2.34	0.186 \pm 0.035
1450 μL Trehaloz çözeltisi	174.33 \pm 1.27	0.169 \pm 0.054
1600 μL Trehaloz çözeltisi	174.06 \pm 2.04	0.166 \pm 0.091



Şekil 5.35. *Liyofilizasyon işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut üzerindeki etki grafiği*



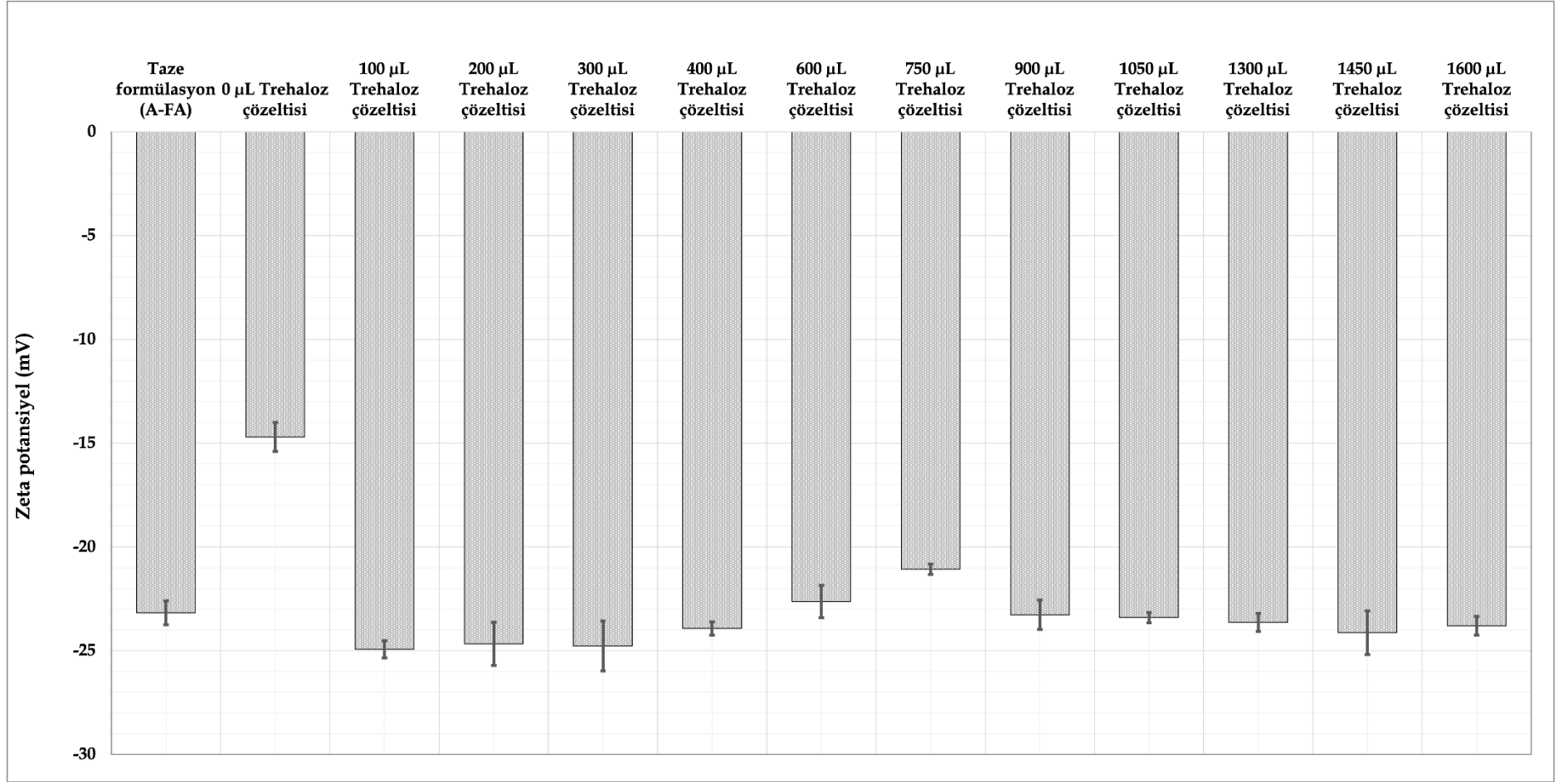
Şekil 5.36. Liyofilizasyon işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut dağılımı (PDI) üzerindeki etki grafiği

5.5.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu için gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemi üzerindeki kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen zeta potansiyel sonuçları Tablo 5.18.'de sunulmuştur. Değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırılabilmesi için Şekil 5.37.'de zeta potansiyel verileri grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.18. *Liyofilizasyon işleminde farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etkisi*

	Zeta Potansiyel (mV, ortalama \pm standart sapma)
Taze formülasyon	-23.17 \pm 0.58
0 μL Trehaloz çözeltisi	-14.70 \pm 0.70
100 μL Trehaloz çözeltisi	-24.93 \pm 0.42
200 μL Trehaloz çözeltisi	-24.67 \pm 1.04
300 μL Trehaloz çözeltisi	-24.77 \pm 1.20
400 μL Trehaloz çözeltisi	-23.93 \pm 0.32
600 μL Trehaloz çözeltisi	-22.63 \pm 0.78
750 μL Trehaloz çözeltisi	-21.07 \pm 0.25
900 μL Trehaloz çözeltisi	-23.27 \pm 0.71
1050 μL Trehaloz çözeltisi	-23.40 \pm 0.25
1300 μL Trehaloz çözeltisi	-23.63 \pm 0.44
1450 μL Trehaloz çözeltisi	-24.13 \pm 1.05
1600 μL Trehaloz çözeltisi	-23.80 \pm 0.45



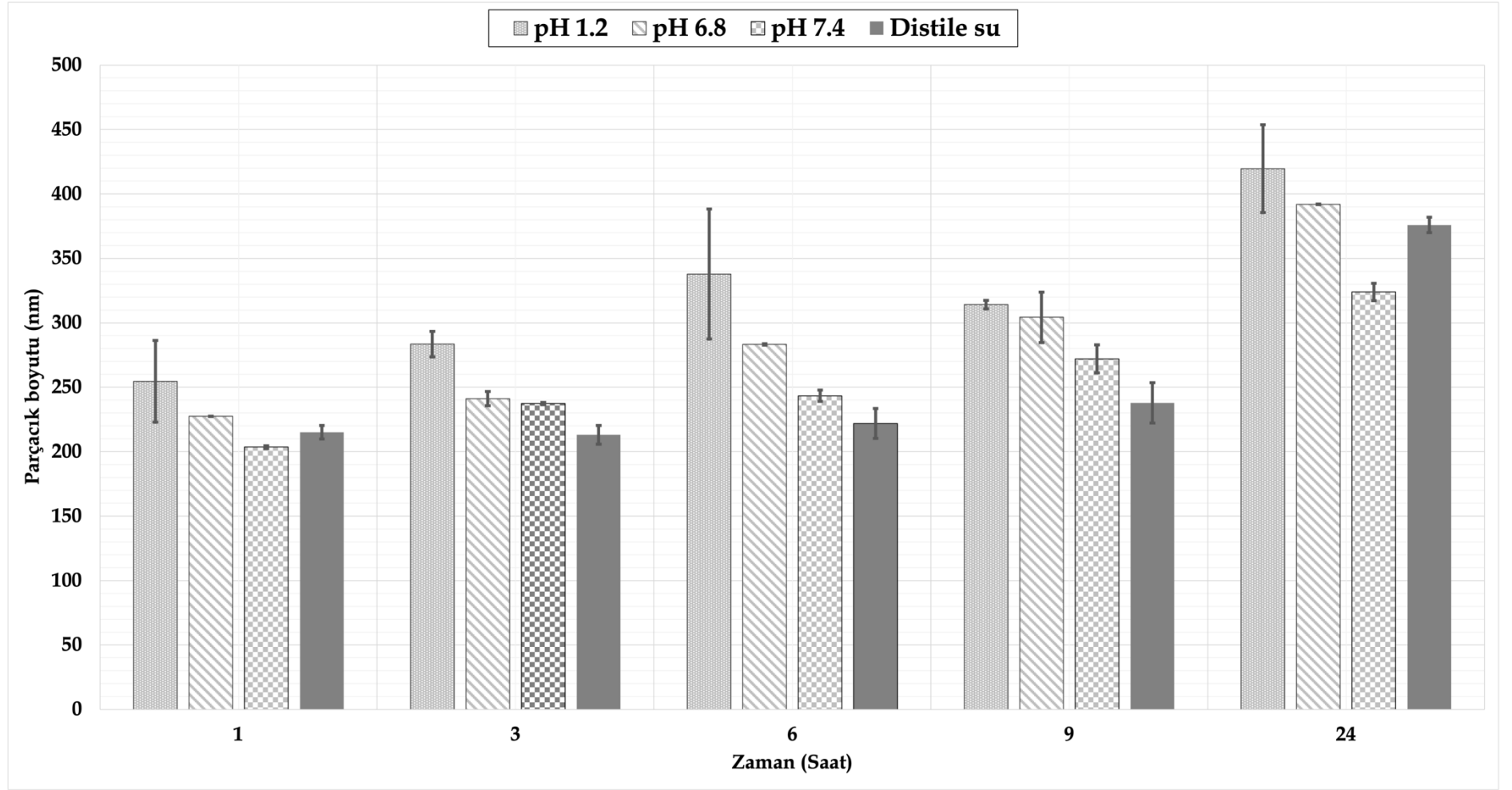
Şekil 5.37. Liyofilizasyon işlemi sonrası farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etki grafiği

5.6. Gastrointestinal stabilite değerlendirme

A-FA kodlu PLGA nanopartikül formülasyonun gastrointestinal sıvıları taklit eden pH 1.2 HCl tamponu, pH 6.8 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu ve distile su içinde 24 saat boyunca gerçekleştirilen kısa süreli kararlılığının incelendiği araştırmanın sonuçları Tablo 5.19.'da sunulmuştur. İlgili sonuçlar verilerin daha net anlaşılması için kısa süreli kararlılık çalışması sonuçları Şekil 5.38.'de sunulmuştur.

Tablo 5.19. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonun gastrointestinal stabilite sonuçları

Saat	Parçacık Boyutu (nm. ortalama ± standart sapma)			
	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.4	Distile su
1	254.5 ± 31.7	227.4 ± 0.1	203.6 ± 1.1	215.1 ± 5.2
3	283.4 ± 9.9	241.2 ± 5.5	237.4 ± 0.8	213.1 ± 7.2
6	337.9 ± 50.5	283.3 ± 0.6	243.4 ± 4.4	221.9 ± 11.7
9	314.1 ± 3.3	304.3 ± 19.6	272.1 ± 10.8	237.8 ± 15.7
24	419.7 ± 34.2	391.9 ± 0.2	323.9 ± 6.6	375.9 ± 6.0



Şekil 5.38. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun gastrointestinal stabilite sonuç grafiği

5.7. Enkapsülasyon etkinliği

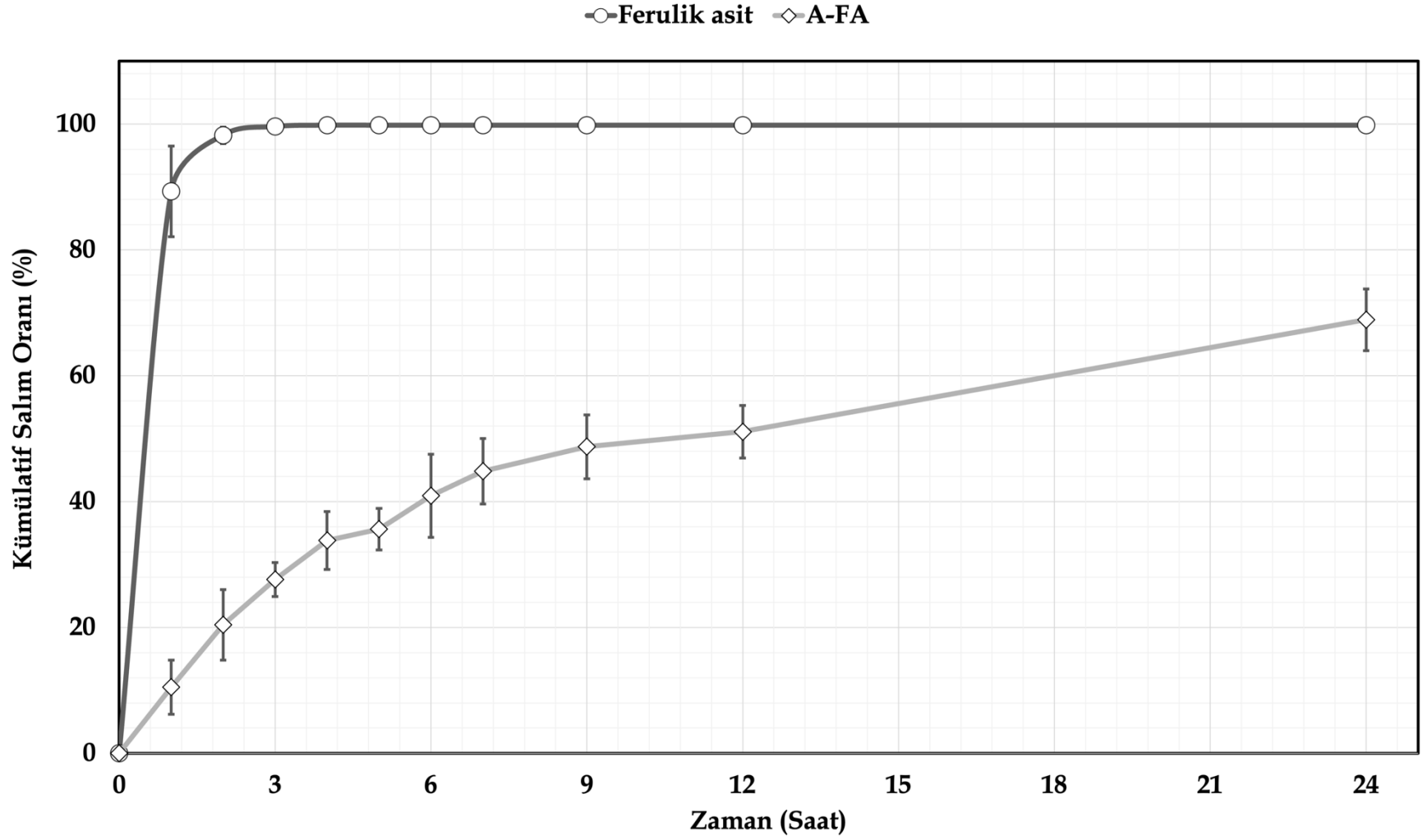
Bölüm ‘4.3.4. Enkapsülasyon etkinliği’ çalışmasında belirtilen Denklem 4.3. ile hesaplanan enkapsülasyon etkinliği sonucu 76.48 ± 3.12 (Ortalama \pm standart sapma) olarak elde edilmiştir (n=3).

5.8. *In vitro* dissolüsyon

Ferulik asit ve ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonuna ait zamana karşı kümülatif çözünen ferulik asit miktarı değerleri ‘ortalama \pm standart sapma’ olarak Tablo 5.20.’de sunulmuştur. Analizler sonrası elde edilen tüm dissolüsyon verileri kullanılarak ferulik asit ve A-FA kodlu nanopartikül formülasyonuna ait 24 saatlik *in vitro* dissolüsyon profilleri Şekil 5.39’da sunulmuştur.

Tablo 5.20. Ferulik asit ve A-FA kodlu formülasyon için % kümülatif salım verileri

Süre (Saat)	Ferulik asit	A-FA
1	89.3 ± 7.9	10.5 ± 4.3
2	98.2 ± 1.3	20.4 ± 5.6
3	99.6 ± 0.3	27.6 ± 2.7
4	99.8 ± 0.3	33.8 ± 4.6
5	99.8 ± 0.3	35.6 ± 3.3
6	99.8 ± 0.3	40.9 ± 6.6
7	99.8 ± 0.3	44.8 ± 5.2
9	99.8 ± 0.3	48.7 ± 5.1
12	99.8 ± 0.3	51.1 ± 4.2
24	99.8 ± 0.3	68.9 ± 4.9



Şekil 5.39. Ferulik asit ve A-FA kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği

5.9. Salım Kinetiği

Sıfırncı-derece, Sıfırncı-derece (T_{lag}), Sıfırncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için 24 saatlik R^2 , $R^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri, ilgili modellerin denklemleri ile beraber Tablo 5.21.'de sunulmuştur.

DDSolver programından otomatik olarak alınan Sıfırncı-derece, Sıfırncı-derece (T_{lag}), Sıfırncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için salım kinetik grafikleri sırasıyla Şekil 5.40.- Şekil 5.66.'da sunulmuştur.

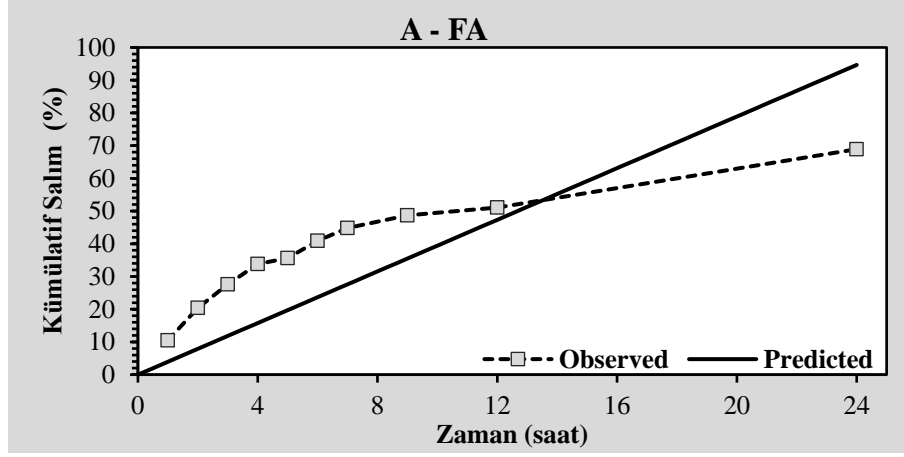
Tablo 5.21. A-FA kodlu formülasyon için 24 saatlik salım kinetiği sonuçları

Model Kodu	Model ^a	R ²	R ² _{adjusted}	MSC	AIC
#301 ^b	Sıfırıncı-derece $F=k_0 * t$	0.009	0.009	-0.191	80.119
#302 ^{b, c}	Sıfırıncı-derece (T _{lag}) $F=k_0 * (t-T_{lag})$	0.833	0.812	1.391	64.303
#303 ^{b, d}	Sıfırıncı derece (F ₀) $F=F_0+k_0 * t$	0.833	0.812	1.391	64.303
#304 ^e	Birinci-derece $F=100 * [1-Exp(-k_1 * t)]$	0.735	0.735	1.127	66.937
#305 ^{e, e}	Birinci-derece (T _{lag}) $F=100 * \{1-Exp[-k_1 * (t-T_{lag})]\}$	0.909	0.898	1.999	58.217
#306 ^{e, f}	Birinci-derece (F _{max}) $F=F_{max} * [1-Exp(-k_1 * t)]$	0.959	0.954	2.794	50.273
#307 ^{e, e, f}	Birinci-derece (T _{lag} ve F _{max}) $F=F_{max} * \{1-Exp[-k_1 * (t-T_{lag})]\}$	0.979	0.973	3.261	45.601
#308 ^g	Higuchi $F=k_H * t^{0.5}$	0.953	0.953	2.865	49.561
#309 ^{e, g}	Higuchi (T _{lag}) $F=k_H * (t-T_{lag})^{0.5}$	0.918	0.908	2.104	57.170
#310 ^{d, g}	Higuchi (F ₀) $F=F_0+k_H * t^{0.5}$	0.956	0.951	2.728	50.930
#311 ^h	Korsmeyer-Peppas $F=k_{KP} * t^n$	0.934	0.925	2.311	55.099
#312 ^{e, h}	Korsmeyer-Peppas (T _{lag}) $F=k_{KP} * (t-T_{lag})^n$	0.936	0.918	2.155	56.657
#313 ^{d, h}	Korsmeyer-Peppas (F ₀) $F=F_0+k_{KP} * t^n$	0.782	0.719	0.922	68.993
#314 ⁱ	Hixson-Crowell $F=100 * [1-(1-k_{HC} * t)^3]$	0.584	0.584	0.677	71.440
#315 ^{e, i}	Hixson-Crowell (T _{lag}) $F=100 * \{1-[1-k_{HC} * (t-T_{lag})]^3\}$	0.887	0.873	1.780	60.413
#316 ^j	Hopfenberg $F=100 * [1-(1-k_{HB} * t)^n]$	0.678	0.638	0.733	70,881
#317 ^{e, j}	Hopfenberg (T _{lag}) $F=100 * \{1-[1-k_{HB} * (t-T_{lag})]^n\}$	0.887	0.855	1.580	62.413
#318 ^k	Baker-Lonsdale $3/2 * [1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL} * t$	0.970	0.970	3.315	45.059
#319 ^{e, k}	Baker-Lonsdale (T _{lag}) $3/2 * [1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL} * (t-T_{lag})$	0.965	0.960	2.945	48.763
#322 ^m	Peppas-Sahlin 1 $F=k_1 * t^m+k_2 * t^{(2*m)}$	0.963	0.953	2.709	51.118
#323 ^{e, m}	Peppas-Sahlin 1 (T _{lag}) $F=k_1 * (t-T_{lag})^m+k_2 * (t-T_{lag})^{(2*m)}$	0.986	0.979	3.471	43.503
#324 ⁿ	Peppas-Sahlin 2 $F=k_1 * t^{0.5}+k_2 * t$	0.970	0.967	3.119	47.020

#325 ^{c, n}	Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}) $F=k_1 * (t-T_{lag})^{0.5} + k_2 * (t-T_{lag})$	0.989	0.986	3.936	38.849
#328 ^{p, q}	Weibull 1 $F=100 * \{1-Exp[-((t-T_i)^\beta)/\alpha]\}$	0.987	0.983	3.736	40.851
#329 ^p	Weibull 2 $F=100 * \{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.973	0.970	3.213	46.081
#330 ^{f, p}	Weibull 3 $F=F_{max} * \{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.984	0.980	3.556	42.655
#331 ^{f, p, q}	Weibull 4 $F=F_{max} * \{1-Exp[-((t-T_i)^\beta)/\alpha]\}$	0.987	0.980	3.518	43.026

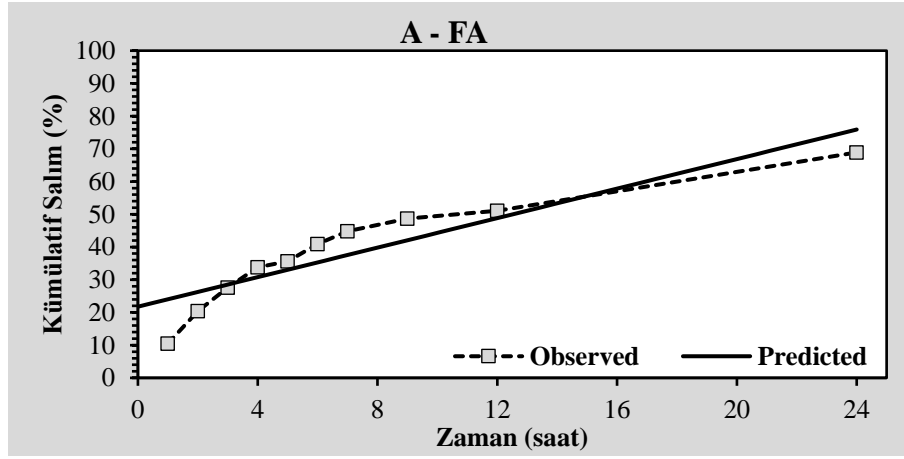
Tablo 5.21. (Devam) A-FA kodlu formülasyon için 24 saatlik salım kinetiği sonuçları

Açıklamalar: **Rsqr** korelasyon katsayısı (r^2); **Rsqr_adj** düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$); **AIC** Akaike bilgi kriteri; **MSC** Model seçme kriteri; ^a Tüm modellerde **F**, **t** zamanında salınan ilacın fraksiyonudur (%); ^b **k₀** sıfır dereceli serbest bırakma sabitidir; ^c **T_{lag}** ilaç salınımından önceki gecikme süresidir; ^d **F₀** bir patlama salımından kaynaklanan çözeltideki ilacın başlangıç fraksiyonudur; ^e **k₁** birinci dereceden serbest bırakma sabitidir; ^f **F_{max}** sonsuz zamanda salınan ilacın maksimum fraksiyonudur; ^g **k_H** Higuchi salım sabitidir; ^h **k_{KP}** ilaç dozaj formunun yapısal ve geometrik özelliklerini içeren salım sabitidir; **n** ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyon üssüdür; ⁱ **k_{HC}** Hixson–Crowell modelindeki salım sabitidir; ^j **k_{HB}** Hopfenberg modelindeki birleşik sabittir, $k_{HB}=k_0/(C_0 \times a_0)$, burada **k₀** erozyon oranı sabitidir, **C₀** matriksteki ilk ilaç konsantrasyonudur ve **a₀** bir küre veya silindir için başlangıç yarıçapıdır veya bir levhanın yarı kalınlığı, **n** bir levha, silindir ve küre için sırasıyla 1, 2 ve 3'tür; ^k **k_{BL}**, Baker-Lonsdale modelindeki birleşik sabittir, $k_{BL}=[3 \times D \times C_s / (r_0^2 \times C_0)]$, burada **D** difüzyon katsayısıdır, **C_s** doyma çözünürlüğüdür, **r₀** bir küre için başlangıç yarıçapıdır veya bir levha için silindir veya yarı kalınlık ve **C₀** matriksteki ilk ilaç yüklemesidir; ^m **k₁** Fickian kinetiğiyle ilgili sabittir, **k₂** Durum-II gevşeme kinetiğiyle ilgili sabittir, **m** kontrollü salınımı engelleyen herhangi bir geometrik şekle sahip bir cihazın yayılma üssüdür; ⁿ **k₁** $t^{0.5}$ 'e bağlı ilaç difüzyonunun ilaç salımına nispi katkısını gösteren sabittir, **k₂**, t 'ye bağlı polimer gevşemesinin ilaç salımına nispi katkısını gösteren sabittir; ^o **k₁** t^2 'ye bağlı ilaç salımının nispi katkısını gösteren Quadratic modeldeki sabittir, **k₂**, t 'ye bağlı ilaç salımının nispi katkısını gösteren Quadratic modeldeki sabittir; ^p **α**, sürecin zaman ölçeğini tanımlayan ölçek parametresidir, **β** eğriyi ya üstel ($\beta=1$; durum 1), sigmoid, S-şekilli, yukarı doğru eğrilik ve ardından bir dönüş noktası ($\beta>1$; durum 2), ya da daha yüksek bir başlangıç eğimi ile ve bundan sonra üstel ile tutarlı ($\beta<1$; durum 3) şekil parametresidir; ^q **T_i**, çözünme veya salıverme sürecinin başlangıcından önceki gecikme süresini temsil eden konum parametresidir ve çoğu durumda sıfıra yakın olmaktadır.



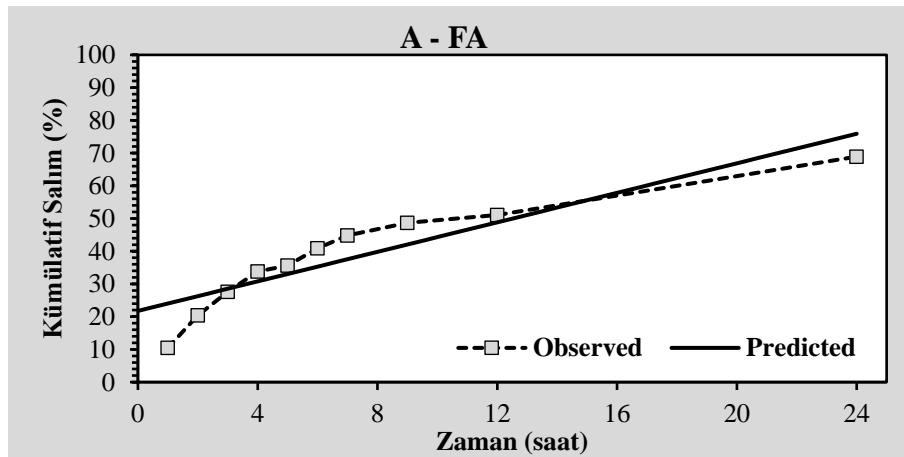
Şekil 5.40. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



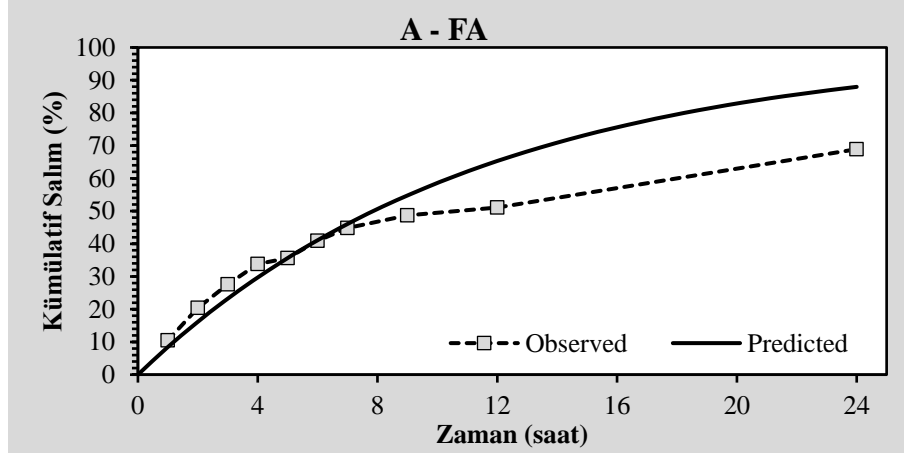
Şekil 5.41. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, Tlag)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.

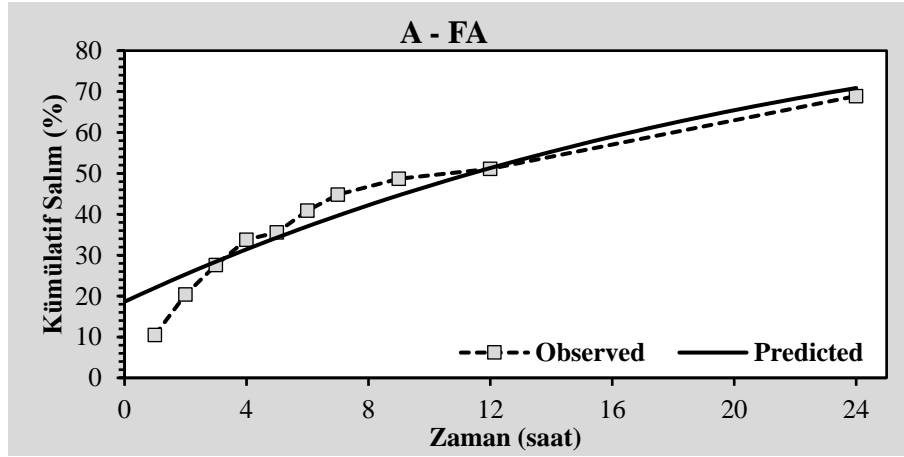


Şekil 5.42. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, F0)

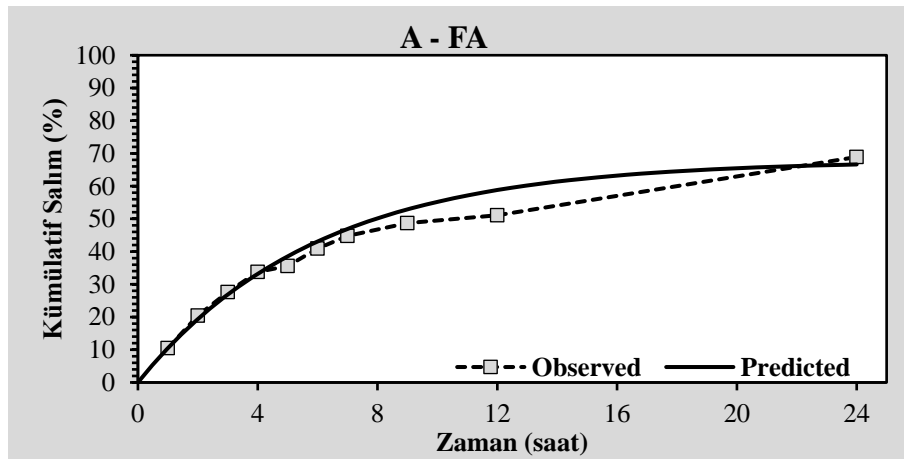
*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



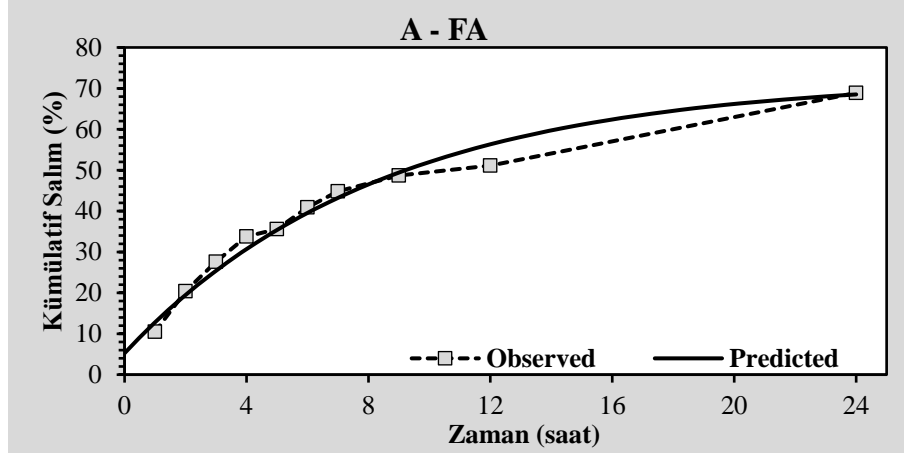
Şekil 5.43. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik)
*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



Şekil 5.44. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, Tlag)
*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.

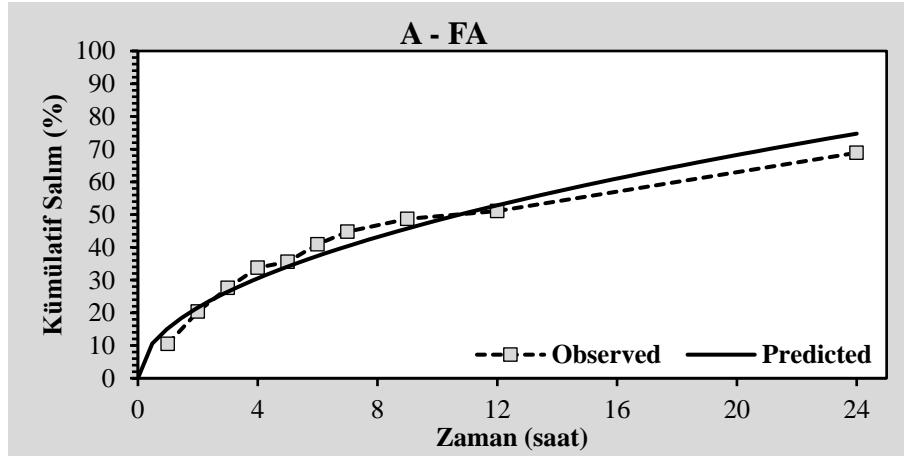


Şekil 5.45. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, Fmax)
*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



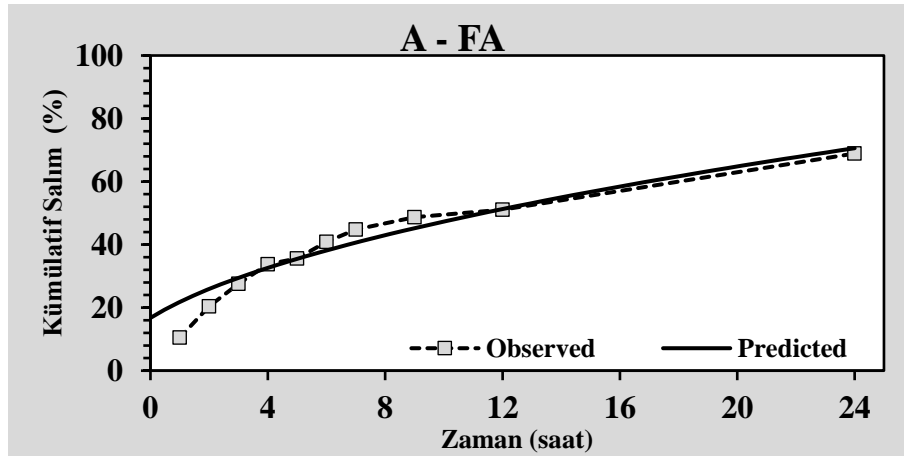
Şekil 5.46. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max} ve T_{lag})

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



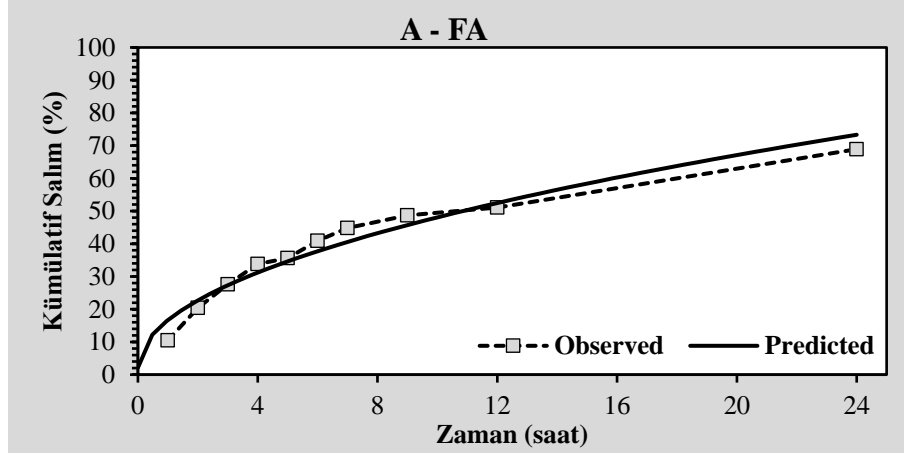
Şekil 5.47. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi Modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.

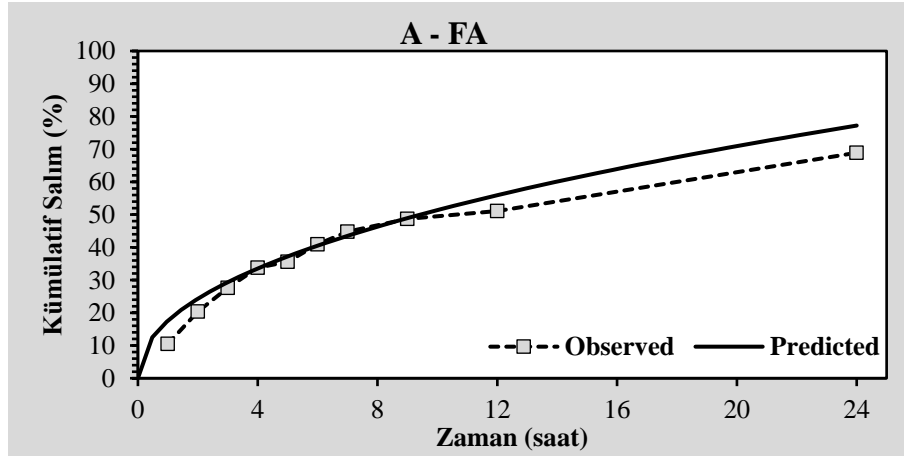


Şekil 5.48. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, T_{lag})

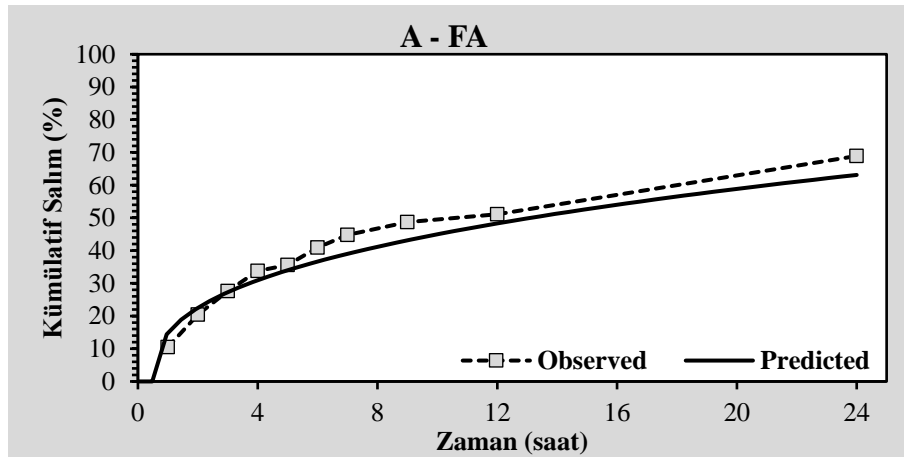
*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



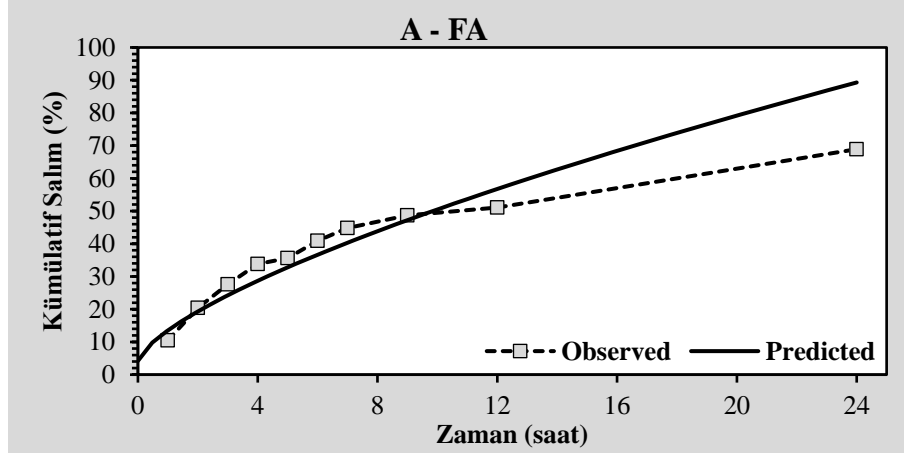
Şekil 5.49. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, F0)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



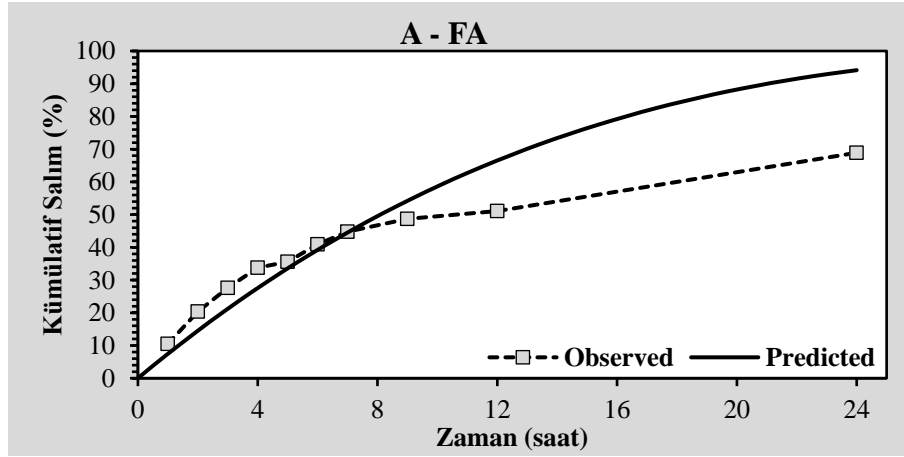
Şekil 5.50. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen salım profili



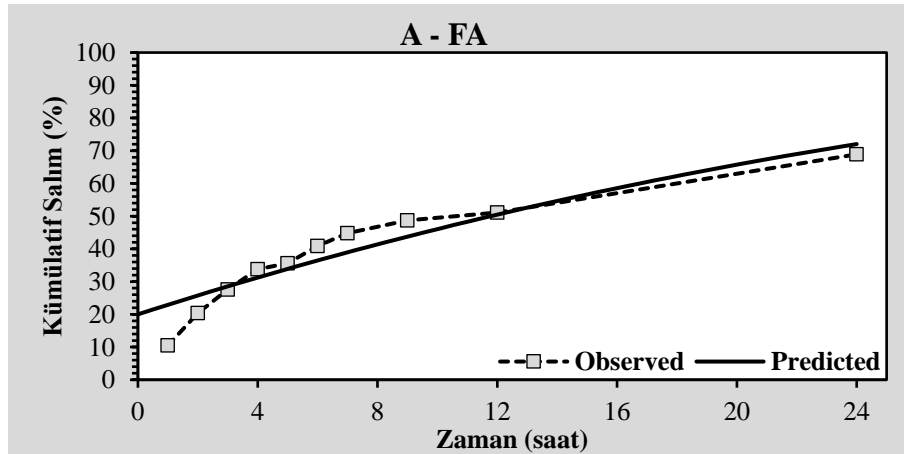
Şekil 5.51. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli, Tlag)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



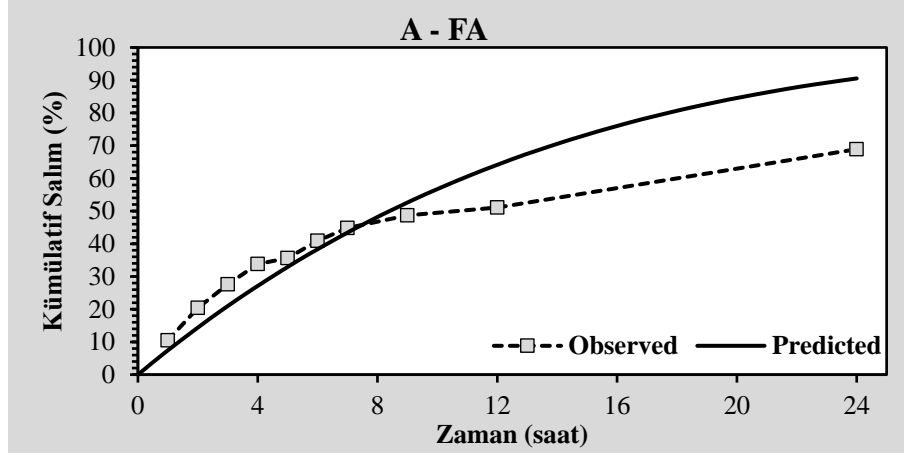
Şekil 5.52. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas modeli, F0)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



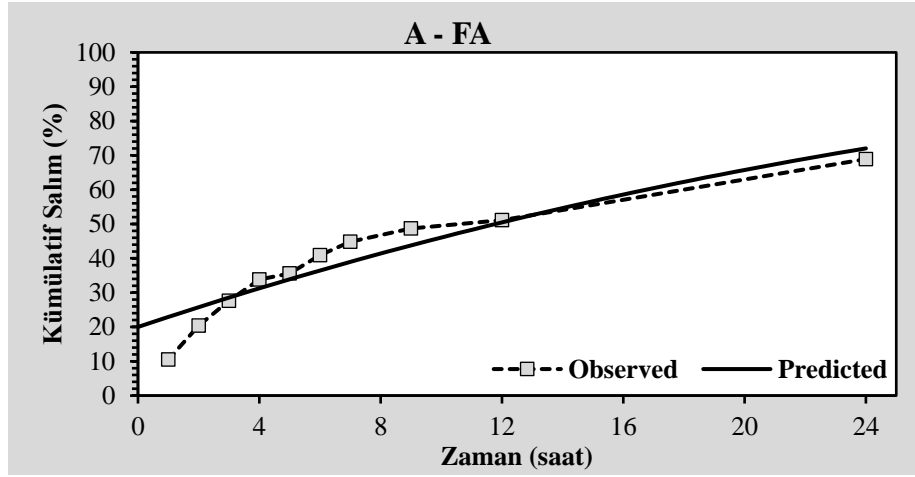
Şekil 5.53. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



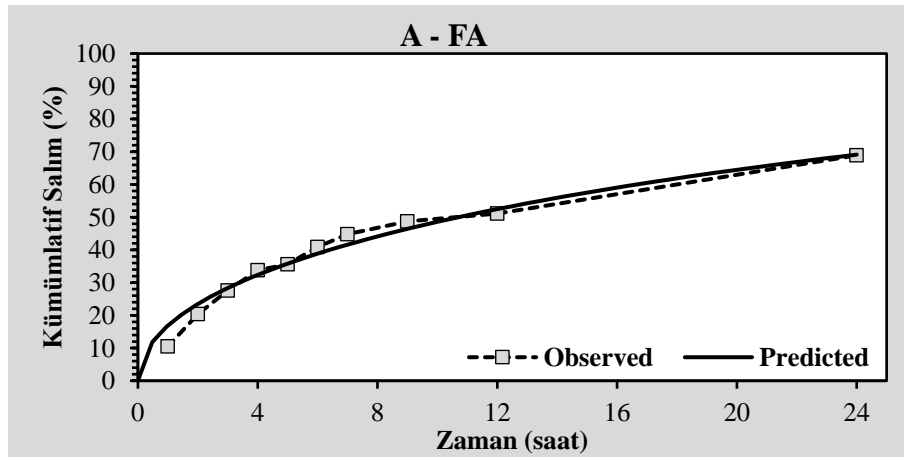
Şekil 5.54. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli, Tlag)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



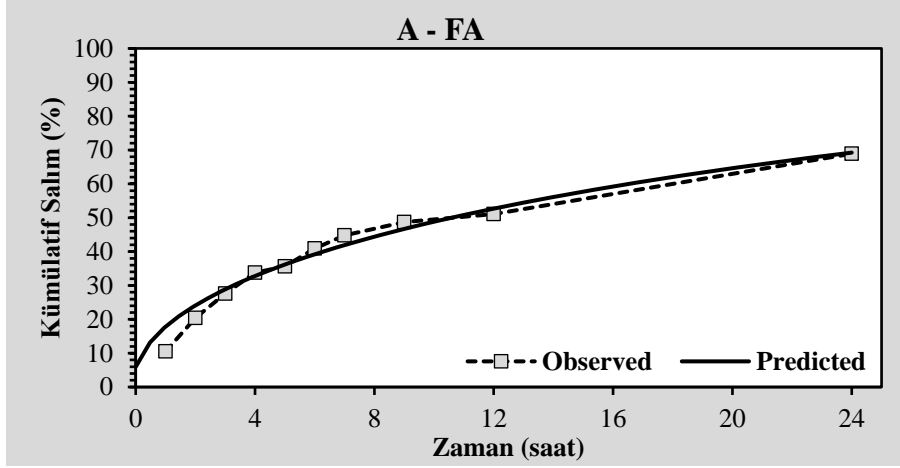
Şekil 5.55. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



Şekil 5.56. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli, Tlag)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.

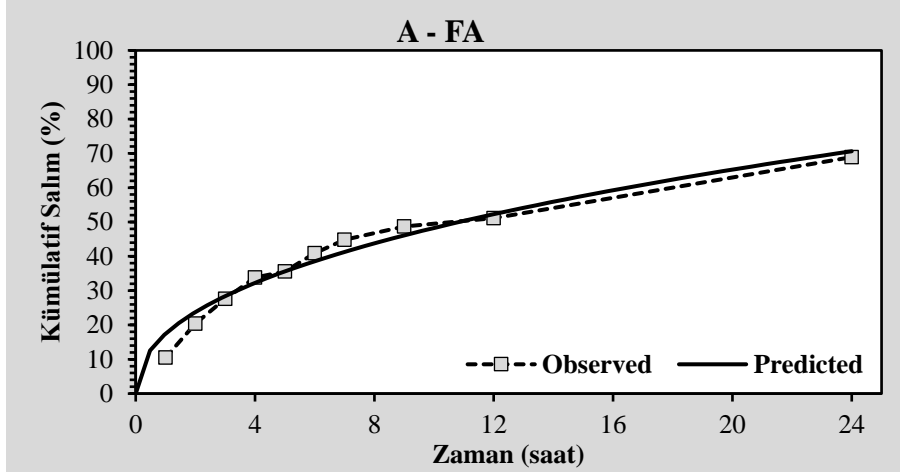


Şekil 5.57. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



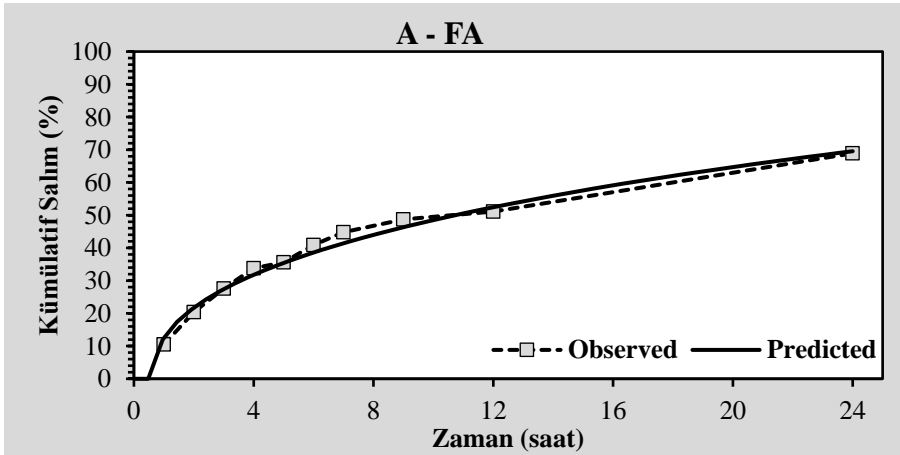
Şekil 5.58. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli, Tlag)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



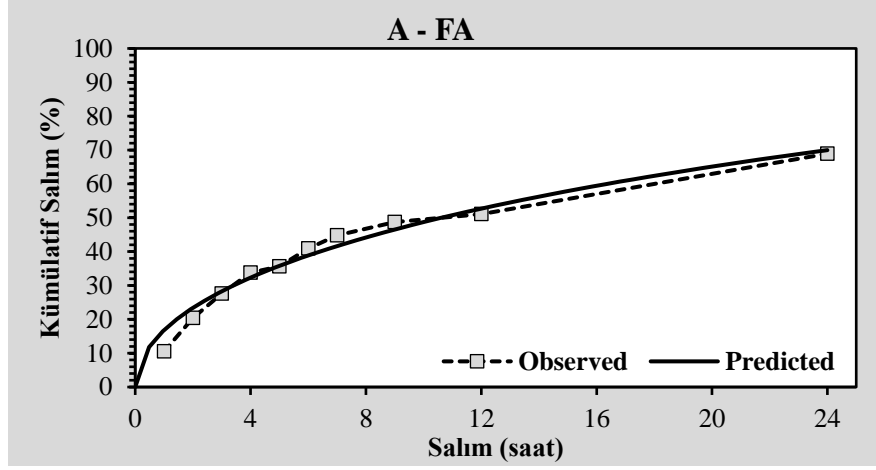
Şekil 5.59. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



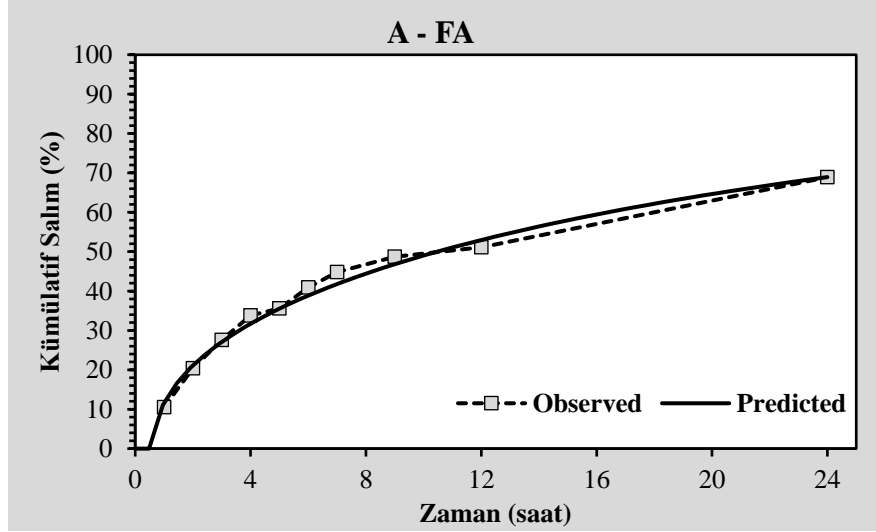
Şekil 5.60. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli, Tlag)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



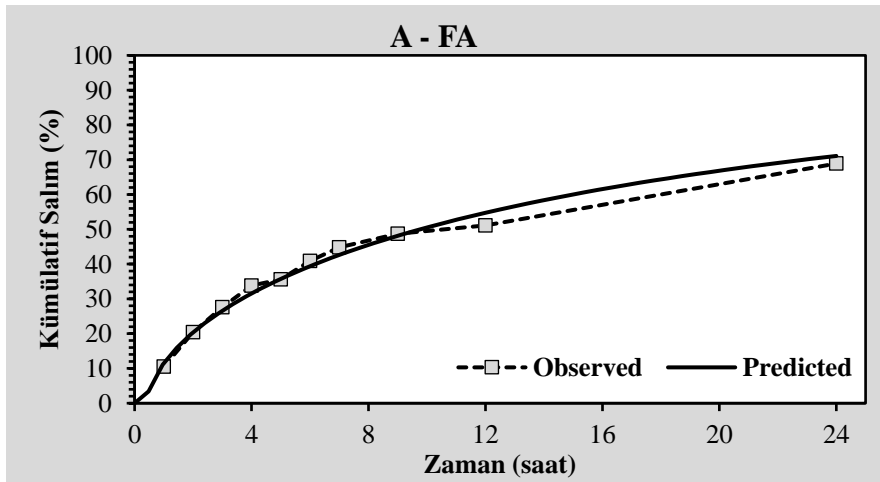
Şekil 5.61. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



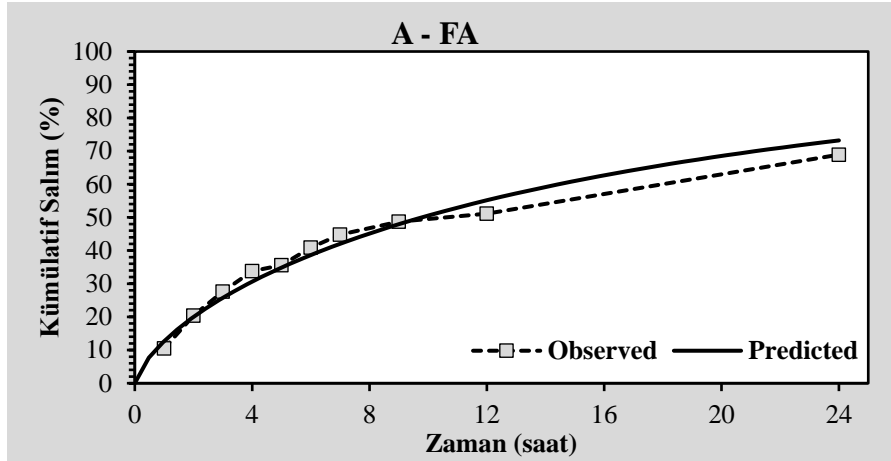
Şekil 5.62. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli, Tlag)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



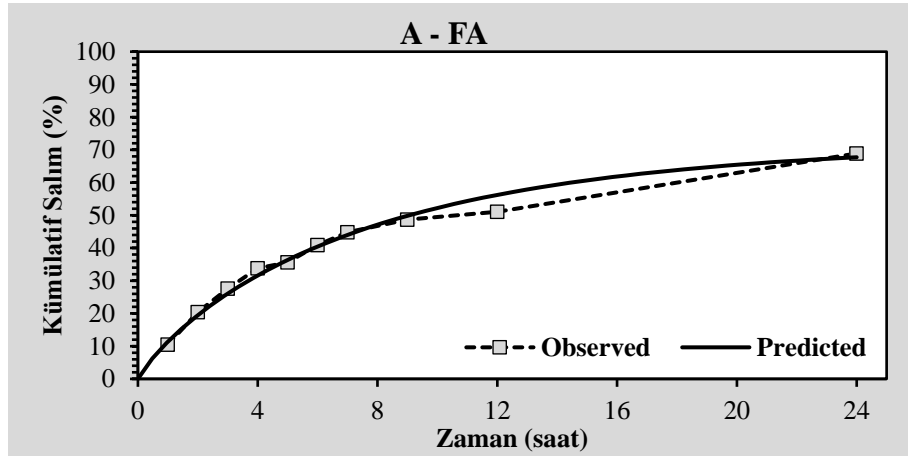
Şekil 5.63. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 1 modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



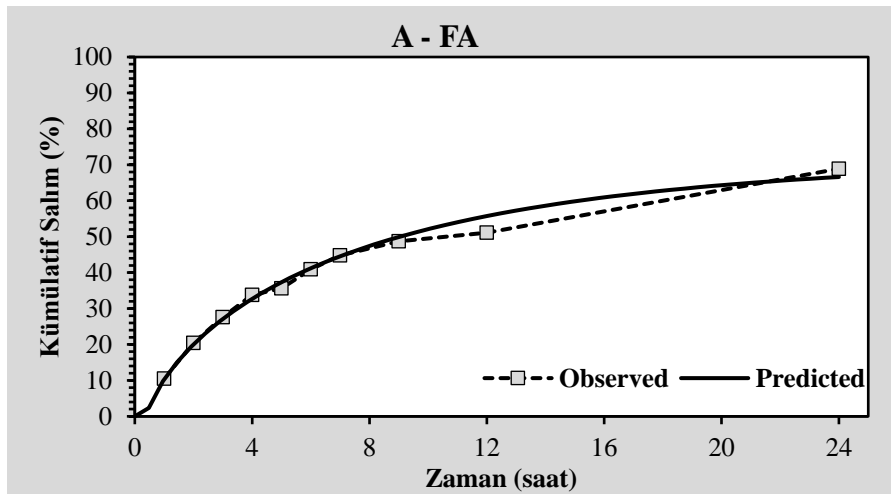
Şekil 5.64. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 2 modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



Şekil 5.65. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 3 modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



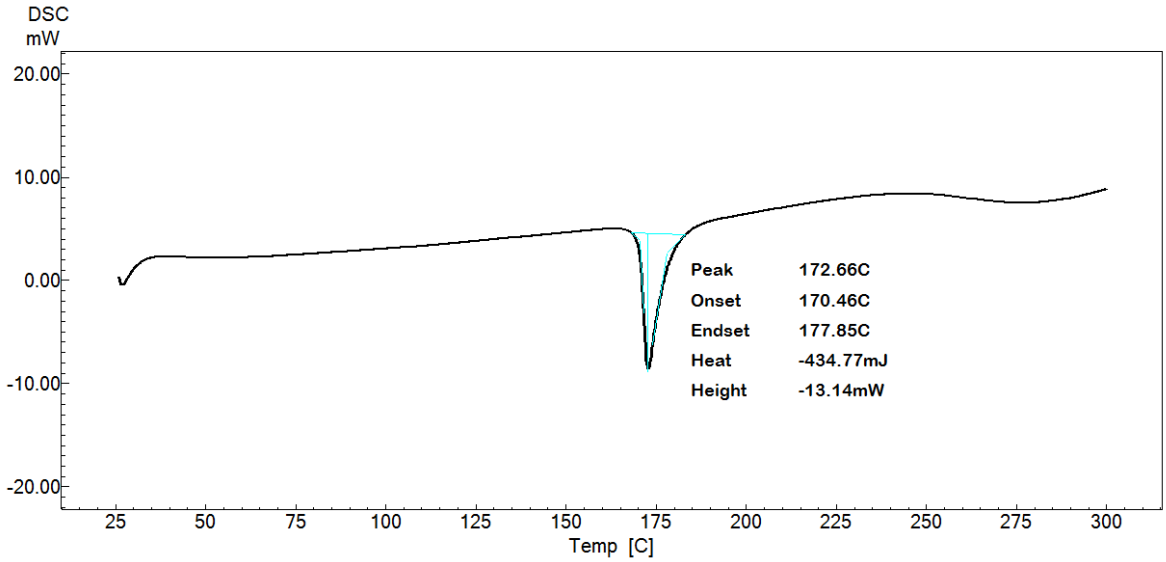
Şekil 5.66. A-FA kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 4 modeli)

*Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.

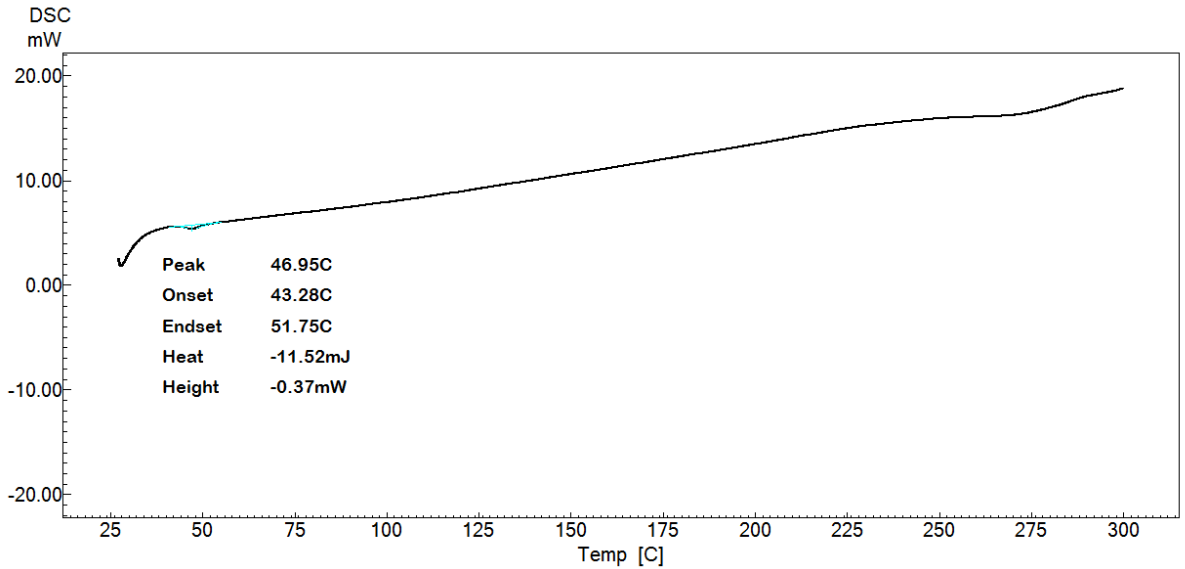
5.10. Katı hal karakterizasyonları

5.10.1. Termal analiz

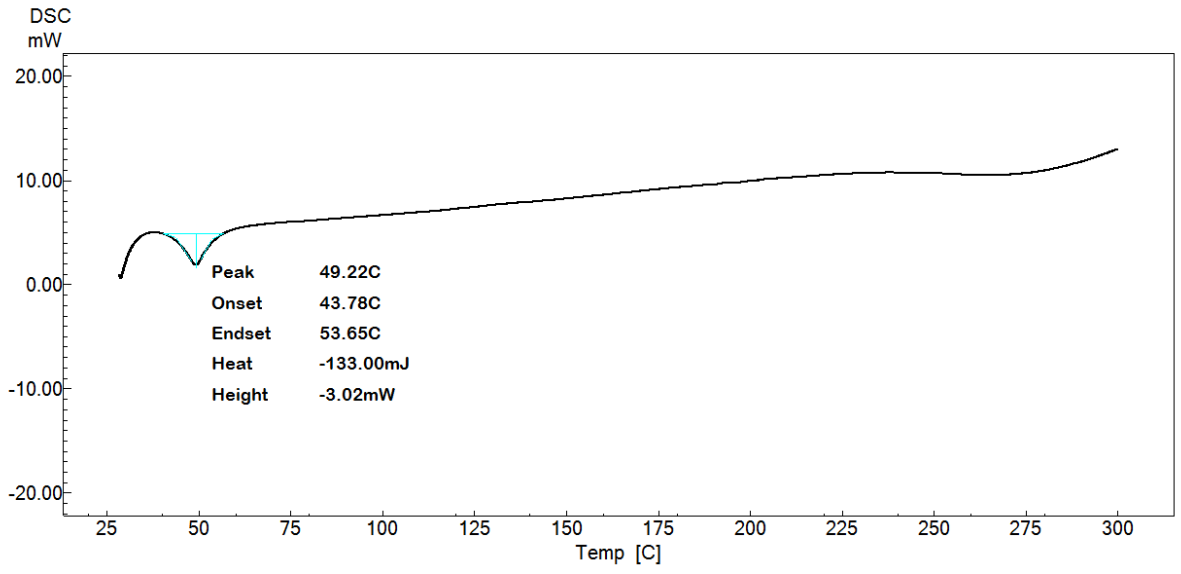
Ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait termogramlar / DSC eğrileri sırasıyla Şekil 5.67., Şekil 5.68., Şekil 5.69., Şekil 5.70. ve Şekil 5.71.'de sunulmuştur.



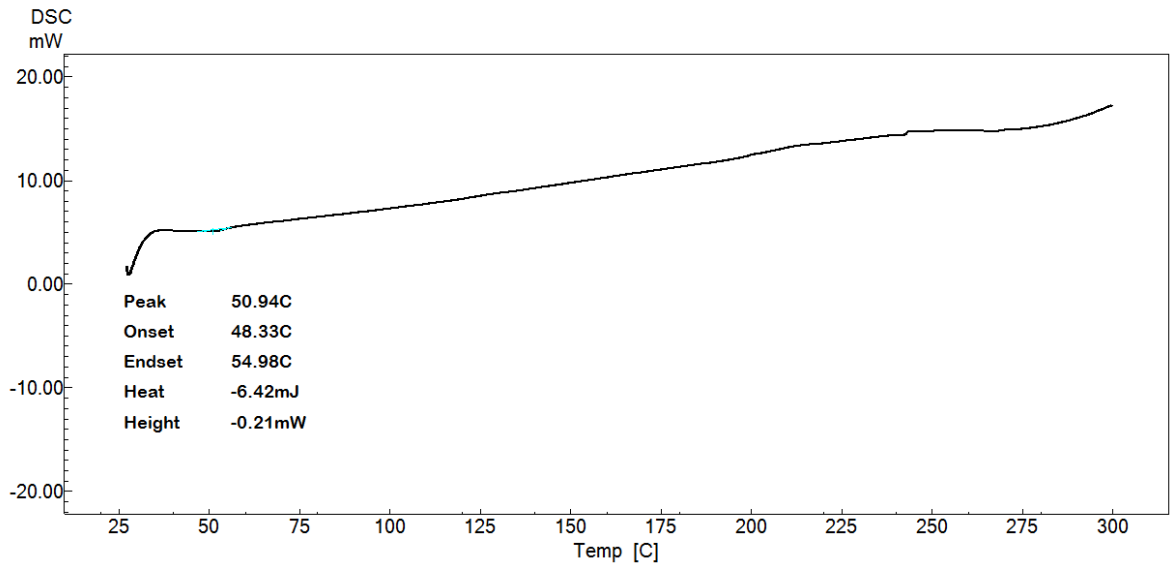
Şekil 5.67. Ferulik asit'e ait DSC eğrisi



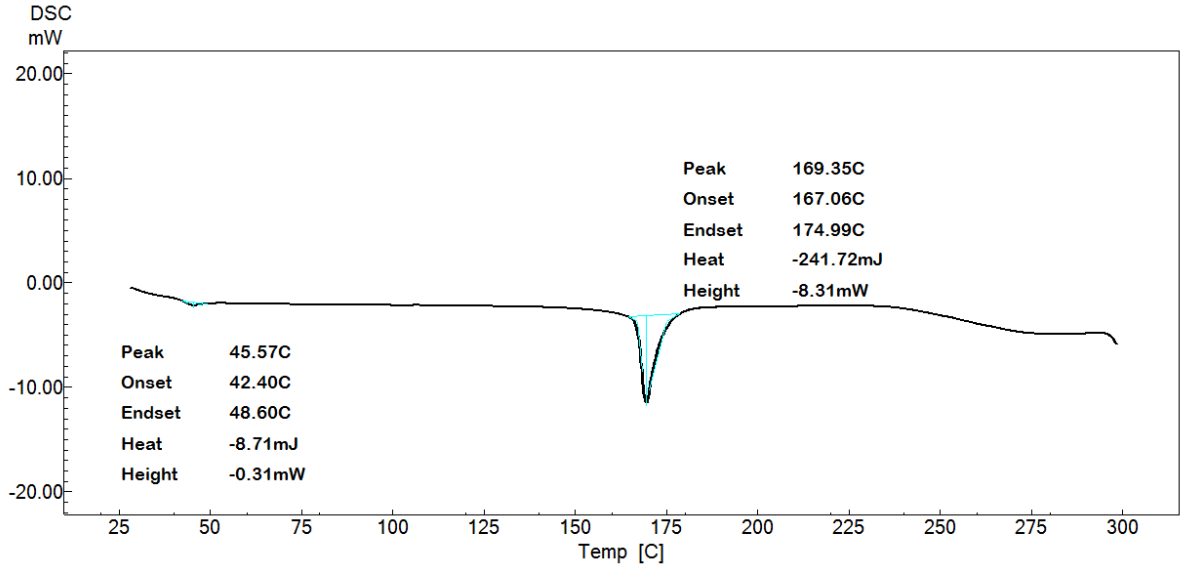
Şekil 5.68. PLGA polimerine ait DSC eğrisi



Şekil 5.69. A-Blank kodlu formülasyona ait DSC eğrisi



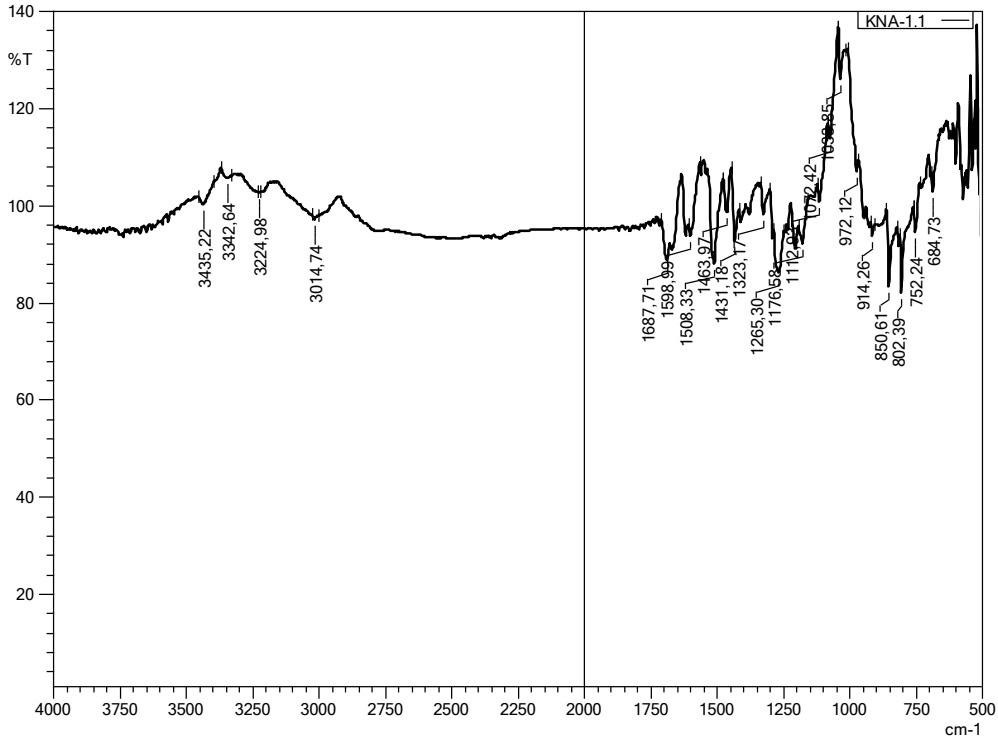
Şekil 5.70. A-FA kodlu formülasyona ait DSC eğrisi



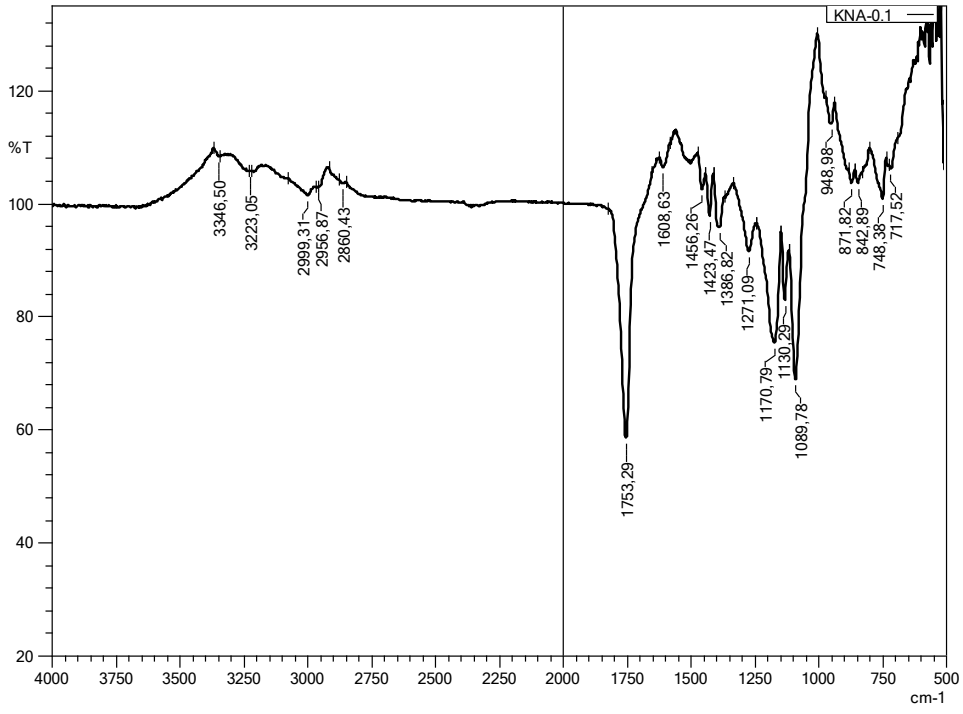
Şekil 5.71. Fiziksel karışıma ait DSC eğrisi

5.10.2. FT-IR analizleri

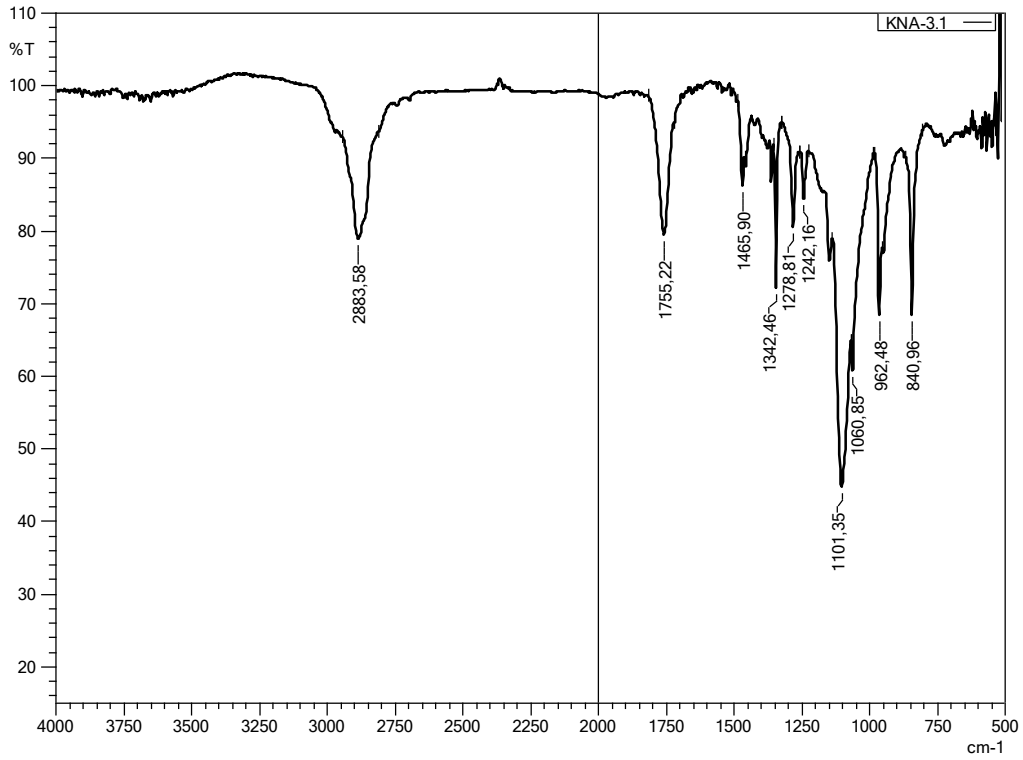
Ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 5.72., Şekil 5.73., Şekil 5.74., Şekil 5.75. ve Şekil 5.76.'da sunulmuştur.



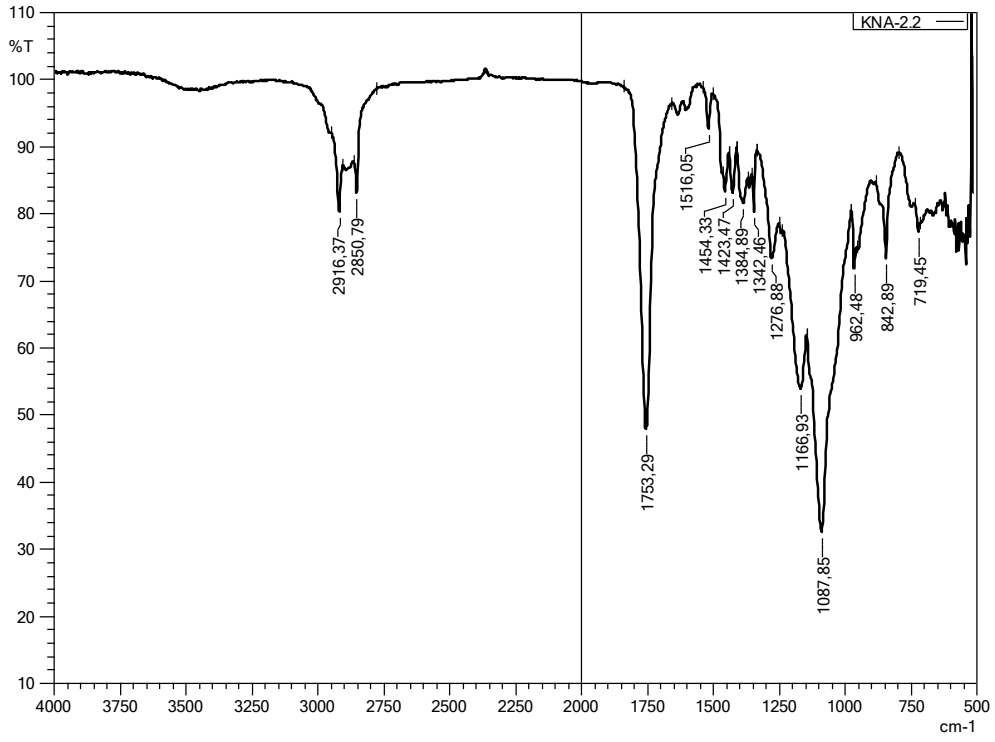
Şekil 5.72. Ferulik asit'e ait FT-IR spektrumu



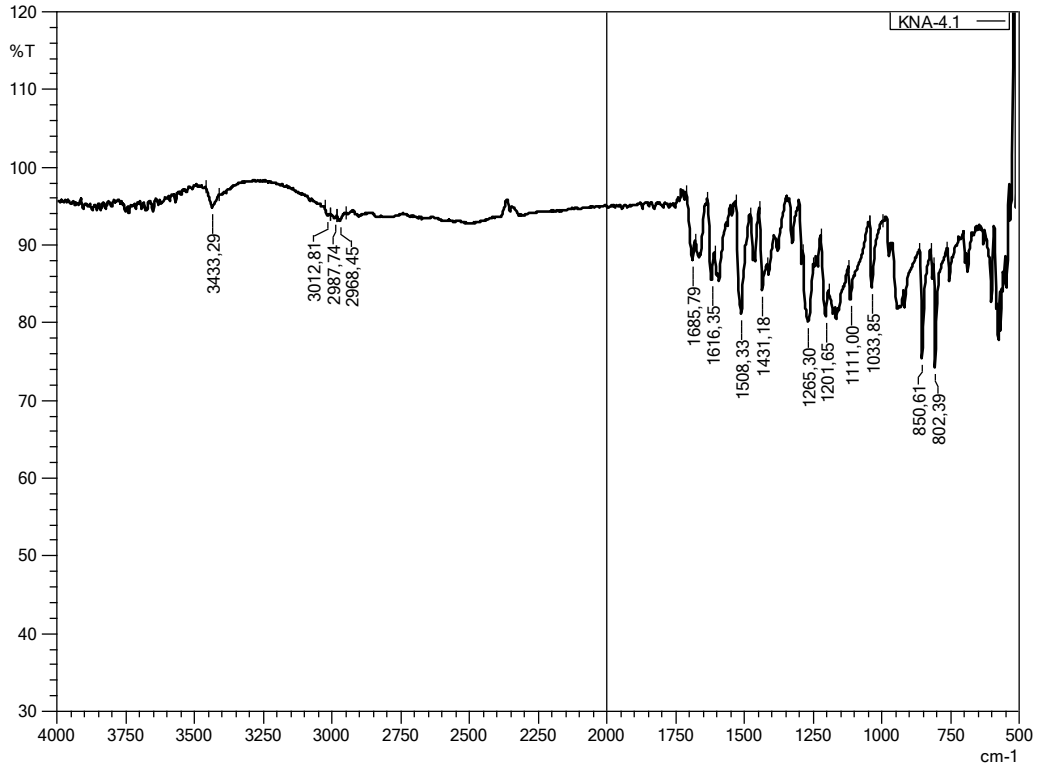
Şekil 5.73. PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.74. A-Blank kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu



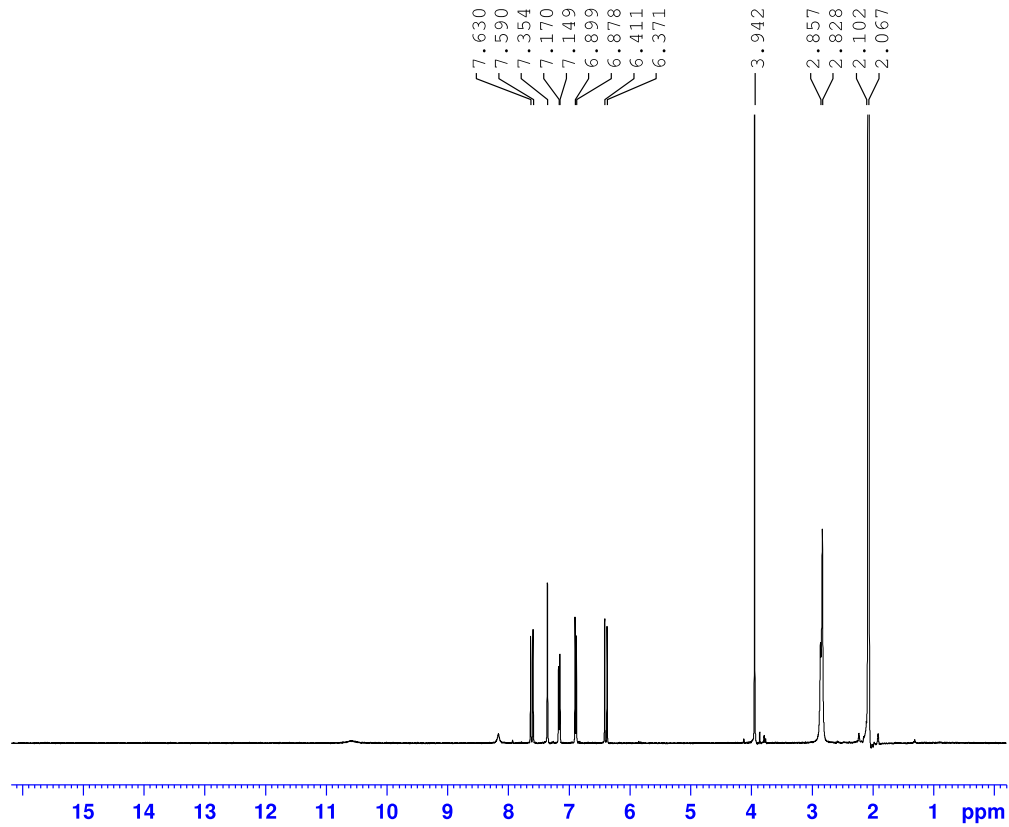
Şekil 5.75. A-FA kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.76. Fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumu

5.10.3. ¹H-NMR analizleri

Ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait ¹H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 5.77., Şekil 5.78., Şekil 5.79., Şekil 5.80. ve Şekil 5.81.'de sunulmuştur.



```

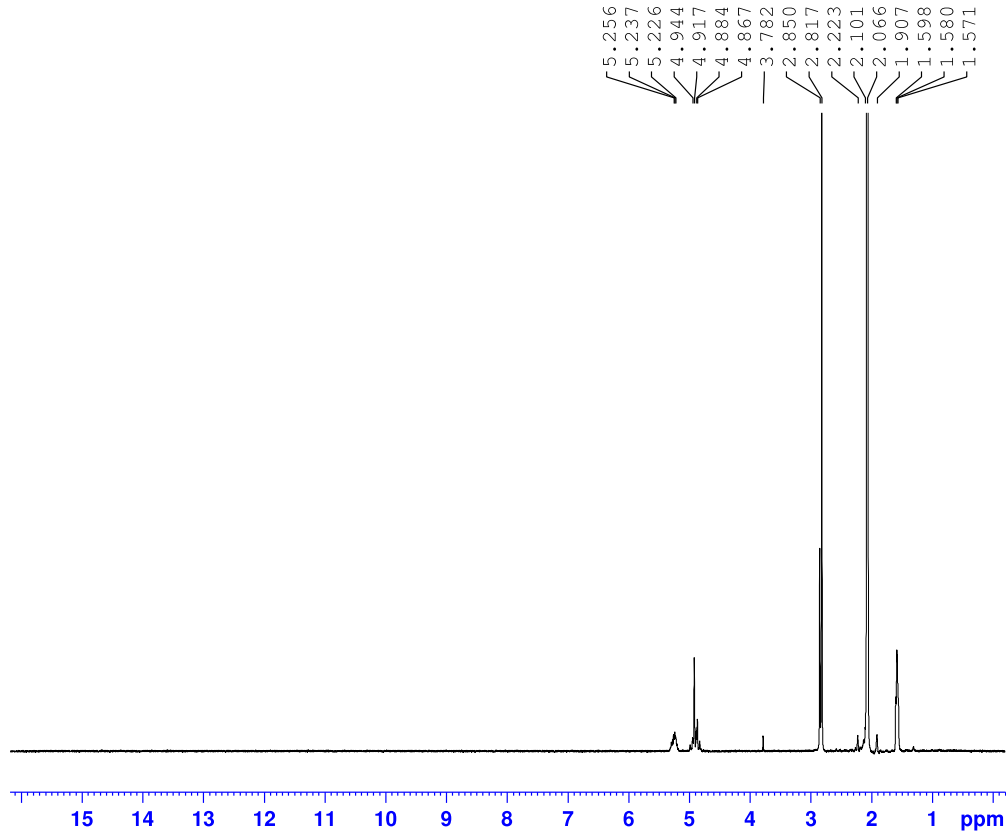
Current Data Parameters
NAME          KNA-1
EXPNO         10
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20230512
Time          9.17 h
INSTRUM       spect
PROBHD        Z866401_0004 (
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       Acetone
NS            16
DS            2
SWH           8012.820 Hz
FIDRES        0.244532 Hz
AQ            4.0894465 sec
RG            280.31
DW            62.400 usec
DE            6.50 usec
TE            295.3 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1
SF01          400.1324708 MHz
NUC1          1H
P1            8.00 usec
PLW1         10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            400.1300000 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00

```

Şekil 5.77. Ferulik asit'e ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

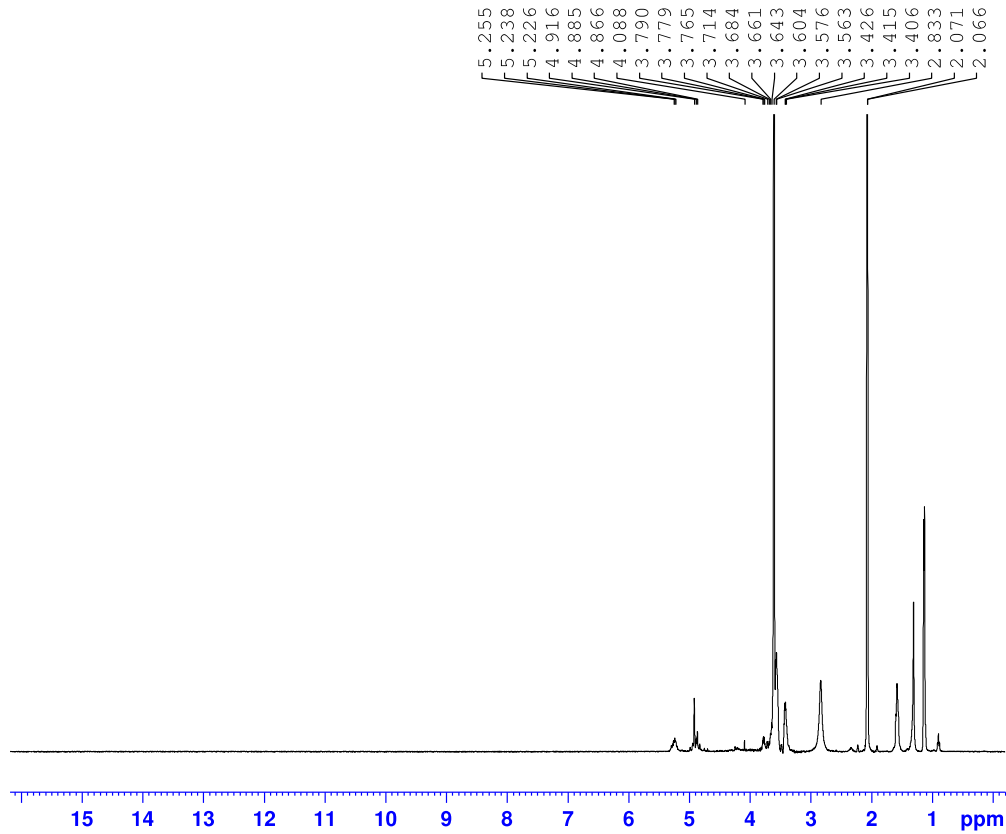


Current Data Parameters
 NAME KNA-0
 EXPNO 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20230512
 Time 9.25 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z866401_0004 (
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT Acetone
 NS 16
 DS 2
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.244532 Hz
 AQ 4.0894465 sec
 RG 490.89
 DW 62.400 usec
 DE 6.50 usec
 TE 295.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 SFO1 400.1324708 MHz
 NUC1 1H
 P1 8.00 usec
 PLW1 10.94900036 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Şekil 5.78. PLGA polimerine ait ¹H-NMR spektrumu

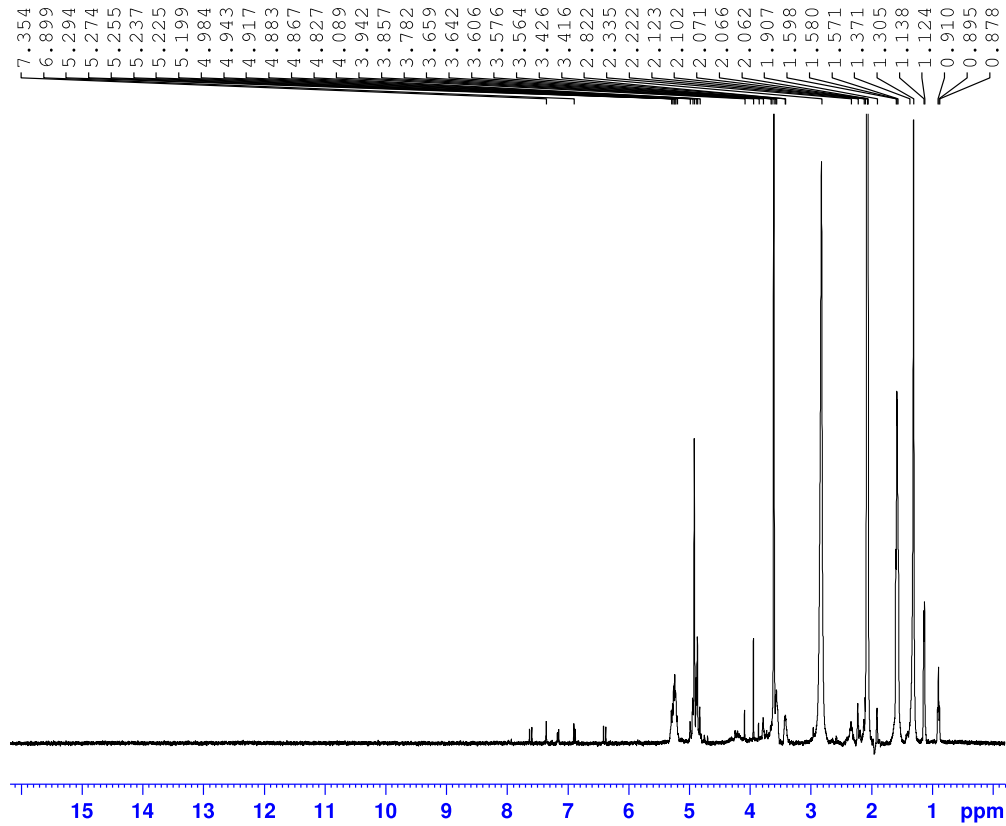


Current Data Parameters
NAME KNA-3
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20230512
Time 9.32 h
INSTRUM spect
PROBHD zg30
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 16
DS 2
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 4.0894465 sec
RG 176.94
DW 62.400 usec
DE 6.50 usec
TE 295.1 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
SF01 400.1324708 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Şekil 5.79. A-Blank kodlu formülasyona ait ¹H-NMR spektrumu

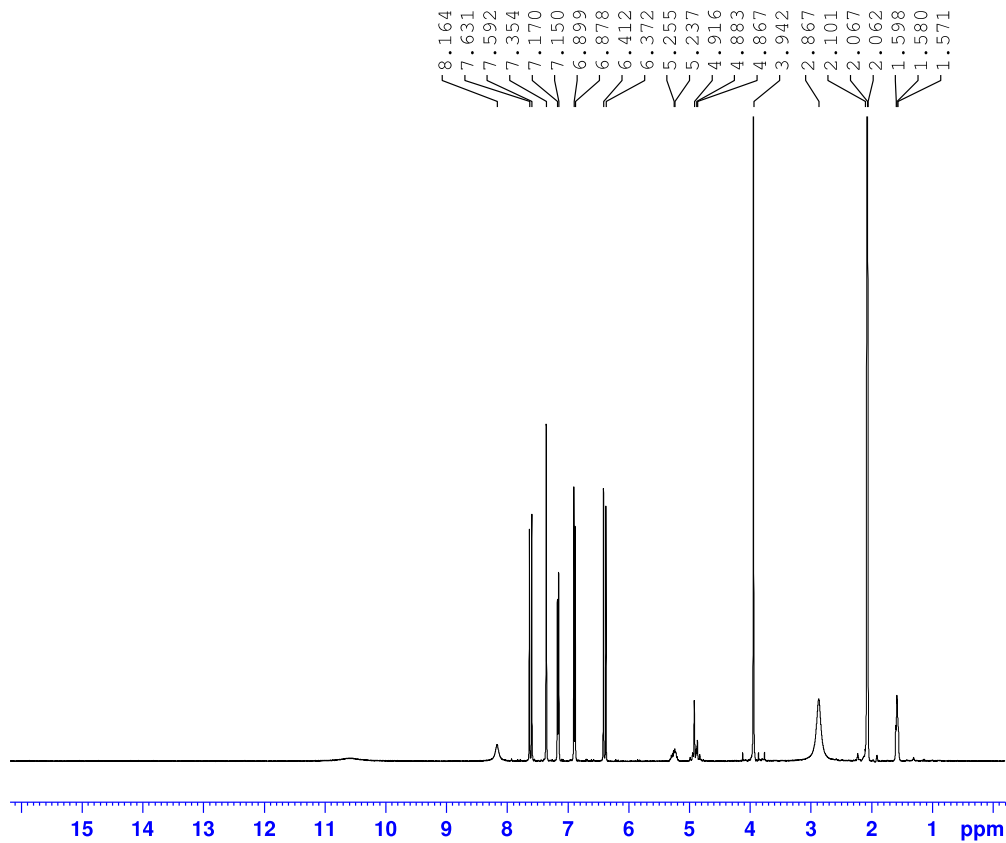


Current Data Parameters
NAME KNA-2
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20230512
Time 9.21 h
INSTRUM spect
PROBHD Z866401_0004 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 16
DS 2
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 4.0894465 sec
RG 280.31
DW 62.400 usec
DE 6.50 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1
SFO1 400.1324708 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLWL 10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Şekil 5.80. A-FA kodlu formülasyona ait ¹H-NMR spektrumu



Current Data Parameters
 NAME KNA-4
 EXPNO 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20230512
 Time 9.29 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z866401_0004 (
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT Acetone
 NS 16
 DS 2
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.244532 Hz
 AQ 4.0894465 sec
 RG 199.34
 DW 62.400 usec
 DE 6.50 usec
 TE 295.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 SFO1 400.1324708 MHz
 NUC1 1H
 P1 8.00 usec
 PLW1 10.94900036 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Şekil 5.81. Fiziksel karışıma ait ¹H-NMR spektrumu

5.11. Antioksidan etkinlik çalışmaları

5.11.1. ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi sonuçları

ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi sonuçları Tablo 5.22.'te sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre BHT ve askorbik asit ile karşılaştırıldığında A-Blank aktivite göstermezken, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve ferulik asit belirgin ABTS^{•+} katyon renksizleştirici antioksidan aktivite göstermiştir. Aktivite sıralaması A-FA > ferulik asit > askorbik asit > BHT olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.22. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank için ABTS^{•+} yöntemi aktivite sonuçları

Test maddesi	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
Ferulik asit	0.2454
A-FA	0.2146
A-Blank	-
Askorbik asit	0.2545
BHT	0.4325

*(-) aktivite görülmemiştir.

5.11.2. Redükleyici güç sonuçları

Redükleyici güç yöntemi sonuçları Tablo 5.23.'te sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre BHT ve askorbik asit ile karşılaştırıldığında en yüksek redükleyici gücü A-FA kodlu formülasyon gösterirken en düşük aktiviteyi ferulik asit göstermiştir. A-Blank kodlu formülasyon ise etki göstermemiştir. Aktivite sıralaması askorbik asit > A-FA > BHT > ferulik asit olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.23. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank için Redükleyici güç yöntemi aktivite sonuçları

Test maddesi	EC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
Ferulik asit	0.1721
A-FA	0.097
A-Blank	-
Askorbik asit	0.085
BHT	0.1564

*(-) aktivite görülmemiştir, EC₅₀: 700 nm'de ölçülen absorbansın 0.5 olduğu konsantrasyon (mg.mL⁻¹)

5.11.3. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem sonuçları

DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi sonuçları Tablo 5.24.'te sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre BHT ile karşılaştırıldığında en yüksek DPPH serbest radikal süpürücü antioksidan aktiviteyi A-FA gösterirken en düşük aktiviteyi ferulik asit göstermiştir. A-Blank kodlu formülasyon ise etki göstermemiştir. Aktivite sıralaması A-FA > ferulik asit > BHT olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.24. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank için DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi aktivite sonuçları

Test maddesi	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
Ferulik asit	0.00044
A-FA	0.00040
A-Blank	-
BHT	0.0011

*(-) aktivite görülmemiştir

Sonuç olarak antioksidan aktivite sonuçlarına göre A-FA kuvvetli DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} katyon renksizleştirici ve redükleyici antioksidan aktivite göstermiştir.

5.12. *In vitro* AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etkinin ölçülmesi

5.12.1. AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları

AChE inhibitör aktivite sonuçları Tablo 5.25.'de verilmiştir. Aktivite sonuçlarına göre, asetilkolinesteraz inhibitörü olan donepezil hidroklorür ile karşılaştırıldığında en

yüksek anti-AChE aktiviteyi $121.65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ IC_{50} ile A-FA kodlu formülasyon gösterirken en düşük aktiviteyi A-Blank göstermiştir. Aktivite sıralaması A-FA > donepezil hidroklorür > ferulik asit > A-Blank olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.25. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank formülasyonun AChE inhibitör aktivite sonuçları

Test maddesi	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ferulik asit	407.497
A-FA	121.65
A-Blank	426.80
Donepezil HCl	206.186

5.12.2. BChE İnhibitör Aktivite Sonuçları

BChE inhibitör aktivite sonuçları Tablo 5.26'da verilmiştir. Aktivite sonuçlarına göre, donepezil hidroklorür ile karşılaştırıldığında en yüksek anti-BChE aktiviteyi $419.46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ IC_{50} ile A-FA gösterirken en düşük aktiviteyi ferulik asit göstermiştir. A-Blank ise etki göstermemiştir. Aktivite sıralaması donepezil hidroklorür > FNP > ferulik asit olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.26. Ferulik asit, A-FA ve A-Blank formülasyonun BChE inhibitör aktivite sonuçları

Test maddesi	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ferulik asit	519.75
FNP	419.46
Blank	-
Donepezil HCl	220.750

Sonuç olarak anti-Alzheimer aktivite sonuçlarına göre asetilkolinesteraz inhibitörü olan Donepezil HCl ile karşılaştırıldığında A-FA kuvvetli anti-AChE aktivite göstermiştir ($\text{IC}_{50}=121.65 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

6. TARTIŞMA

6.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları

Farmasötik analizler, farmasötik formülasyonların ve ilaçların kalite kontrol ve güvence açısından incelenmesinde çok önemli bir rol oynar. İlaç endüstrilerindeki hızlı gelişme ve dünya çapında artan ilaç üretimi, ilaç endüstrilerinde yeni ve sistematik analitik teknikler aramak için kaçınılmaz bir talep artışını gündeme getirmektedir. Sonuç olarak, analitik yöntem geliştirme, analizin temel ve ön faaliyeti haline gelmiştir (Ravisankar vd., 2015). Düzenleyici makamlar tarafından verilen ilaç onayları, başvuru sahibinin onaylanmış analitik yöntemler kullanarak tüm ilaç geliştirme sürecinin kontrolünü kanıtlamasını gerektirir (Berkowitz vd., 2012; Ravisankar vd., 2015).

Validasyonun gerekliliklerine bağlı olarak, validasyon deneylerini verimli bir şekilde gerçekleştirmek bazı parametrelere uyulmalıdır ve ICH Q2 (R1) kılavuzları validasyon parametrelerini belirlemiştir (Bretnell ve Clarke 2011). Validasyon; doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, tespit sınırı (LOD) ve miktar tayini / ölçüm sınırı (LOQ) ve seçiciliğin rapor edildiği validasyon sonuçlarıyla belirlenen bir yöntemin güvenilirliğini kontrol etmede kilit faktördür. Valide edilmiş analitik yöntemler, özellikle ilaç endüstrisinde nihai ürünün kalite ve güvenliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Ozkan, 2018).

Analitik yöntemler genel olarak üç temel adımda gerçekleştirilir. Birincisi uygun ve gerekli doğrulama parametrelerinin belirlenmesi, ikincisi parametre değerlendirme için deney tasarımı ve sonucunu kabul kriterlerinin belirlenmesidir (Gumustas vd., 2013; Ozkan 2018). UV spektrofotometri tekniği dışındaki diğer analitik teknikler ve cihazlar pahalılık, karmaşık aletler işlemler gerektirmesi, örneklerden ilaç analizi için zaman alıcı olması gibi dezavantajlara sahiptir (Rapalli vd., 2020). Bu sebeple bu çalışmada UV spektrofotometre tercih edilmiştir.

Tüm tez çalışmasında ferulik asit miktar tayin analizlerinde UV spektrofotometre kullanılmıştır. Tüm çalışmanın validasyon sonuçları '6.1.1. Ferulik asit için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması' ve '6.1.2. Ferulik asit için % 1 Tween 80 PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması' isimli bölümlerde tartışılmıştır.

6.1.1. Ferulik asit için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması

Enkapsülasyon etkinliği (% EE) analizlerinin öncesinde, ferulik asit için spesifik ve seçici olan UV spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiştir.

UV yöntemi, 326.0 nm'de ve kuvars küvet kullanılarak UV-160A / Shimadzu (Japonya) marka UV/VIS Spektrofotometresinde gerçekleştirilmiştir. % EE çalışmasında ferulik asit için kullanılan UV spektrofotometrik miktar tayini yöntemi farklı ICH kriterleri açısından valide edilmiştir. Stok çözelti için, tam tartılan 25 mg ferulik asit, 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve son konsantrasyon 1000.0 µg.mL⁻¹ olacak şekilde aseton: su (1:1, *h/h*) içinde çözündürülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, stok çözeltinin 2.0-10.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyon ile elde edilmiştir. Çözeltiler üç set halinde hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık verilerini değerlendirmek için en küçük kareler regresyon analizi yapılmıştır. Bu validasyon çalışmasının kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) ile belirlenmiştir. Numunelerin aynı konsantrasyonda ve aynı gün içinde analiz edilmesiyle tekrarlanabilirlik değerlendirilmiştir. Farklı günlerdeki (3 gün) testler karşılaştırılarak ara kesinlik incelenmiştir (Mendez vd., 2003). Her konsantrasyon için üç set çözelti (4.0 µg.mL⁻¹, 6.0 µg.mL⁻¹, 8.0 µg.mL⁻¹) hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğruluk, işlemin başında çözeltilere eklenen bilinen miktarlarda ferulik asit referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir (Öztürk ve Güven, 2019d). Bu amaç doğrultusunda tam tartılmış 10 mg ferulik asit, 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve son konsantrasyon 100.0 µg.mL⁻¹ aseton: su (1:1, *h/h*) içinde çözündürülmüş. Bu hazırlanan çözeltiden doğruluk çalışması için 4.0 µg.mL⁻¹, 6.0 µg.mL⁻¹ ve 8.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

5.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda ferulik asit çözeltisinin UV aralığında (200-800 nm) taranmasıyla elde edilen maksimum absorbans 326.0 nm olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 5.1. ve Şekil 5.3.) ve ferulik asit içermeyen A-Blank kodlu boş formülasyon (Bkz. Şekil 5.4.) 326.0 nm'de herhangi bir absorbans vermemiştir. Bu sonuçlar yöntemin seçiciliğini kanıtlar niteliktedir (Rapalli vd., 2020).

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen $y = 0.0977x - 0.0018$ olan regresyon denkleminin korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9995 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 5.2). Literatür ve yasal kılavuzlar incelendiğinde R^2 değerinin 1'e yakın (kabul edilebilir minimum korelasyon katsayısı kriteri, $R^2 = 0.9900$ 'dan büyük olmalıdır) olması gerekmekte ve bu değer yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada 0.9995 olarak elde edilen R^2 değeri yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Borman ve Elder, 2017; Miguez vd., 2022).

Üç farklı gün boyunca yapılan kesinlik çalışması sonucunda 4.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki ferulik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 1.064, % 1.063 ve % 0.256 (Bkz. Tablo 5.2.); 6.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki ferulik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.098, % 0.170 ve % 0.352 (Bkz. Tablo 5.3.); 8.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki ferulik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.266, % 0.195 ve % 0.631 (Bkz. Tablo 5.4.); olarak elde edilen RSD (% , varyasyon katsayısı) değerleri %2'den düşüktür. Ferulik asit'in her bir kesinlik seviyesinde üç tekrarlı çözeltisi için hesaplanan %RSD'nin %2'den az olduğu tespit edildiğinden, yöntemin kesin olduğu sonucuna varılmıştır (Abdelazim vd., 2022).

Doğruluk çalışmasında 4.0 µg.mL⁻¹, 6.0 µg.mL⁻¹ ve 8.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyon için sırasıyla % 99.953 ± 0.512, % 99.884 ± 0.171 ve % 99.935 ± 0.517 olarak elde edilen geri kazanımlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 5.5.). LOD ve LOQ sırasıyla 0.226 µg.mL⁻¹ ve 0.685 µg.mL⁻¹ olarak elde edilmiştir ve uygunluğunu doğrusallıkta çalışılan en düşük konsantrasyonda daha düşük olması ile kanıtlamıştır (Farid vd., 2022; Öztürk vd., 2018b).

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde ferulik asit için aseton: su (1:1 h/h) ortamında seçici, basit ve ucuz bir yöntem geliştirildiği söylenebilir (Öztürk vd., 2019a; Öztürk vd., 2023b).

6.1.2. Ferulik asit için % 1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması

In vitro dissolüsyon analizlerinin öncesinde, ferulik asit için spesifik ve seçici olan UV spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiştir. UV yöntemi, UV-160A / Shimadzu (Japonya) marka UV/VIS Spektrofotometresinde 307.0 nm'de ve kuvars küvet kullanılarak yapılmıştır. Tez çalışmasında ferulik için kullanılan UV spektrofotometrik miktar tayini yöntemi kesinlik, doğrusallık, doğruluk duyarlılık ve seçicilik açısından valide edilmiştir. Stok çözelti için, tam tartılan 25 mg ferulik asit, 25 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve son konsantrasyon 1000.0 µg.mL⁻¹ olacak şekilde %1 Tween 80 içeren PBS 7.4 içinde çözündürülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, stok çözeltinin 2.0-12.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonla elde edilmiştir. Çözeltiler üç set halinde hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık verilerini değerlendirmek için en küçük kareler regresyon analizi yapılmıştır. Bu validasyon çalışmasının kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) ile

belirlenmiştir. Numunelerin aynı konsantrasyonda ve aynı gün içinde analiz edilmesiyle tekrarlanabilirlik değerlendirilmiştir. Farklı günlerdeki (3 gün) testler karşılaştırılarak ara kesinlik incelenmiştir (Mendez vd., 2003). Her konsantrasyon için üç set çözelti ($4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğruluk, işlemin başında çözeltilere eklenen bilinen miktarlarda ferulik asit referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir (Öztürk ve Güven, 2019d). Bu amaç doğrultusunda tam tartılmış 10 mg ferulik asit, 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve son konsantrasyon $100.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ %1 Tween 80 içeren PBS 7.4 içinde çözüldürülmüş. Bu hazırlanan çözeltilerden doğruluk çalışması için $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

$8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda ferulik asit çözeltisinin UV aralığında (200-800 nm) taranmasıyla elde edilen maksimum absorbans 307.0 nm olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 5.5. ve Şekil 5.7.) ve ferulik asit içermeyen A-Blank kodlu boş formülasyon (Bkz. Şekil 5.8.) 307.0 nm 'de herhangi bir absorbans vermemiştir. Bu sonuçlar yöntemin seçiciliğini kanıtlar niteliktedir (Rapalli vd., 2020).

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen $y = 0.0617x + 0.0147$ olan regresyon denkleminin korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9991 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 5.6.). Literatür ve yasal kılavuzlar incelendiğinde R^2 değerinin 1'e yakın (kabul edilebilir minimum korelasyon katsayısı kriteri, $R^2 = 0.9900$ 'dan büyük olmalıdır) olması gerekmekte ve bu değer yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada 0.9991 olarak elde edilen R^2 değeri yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Borman ve Elder, 2017; Mígues vd., 2022).

Üç farklı gün boyunca yapılan kesinlik çalışması sonucunda $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ferulik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.617, % 0.619 ve % 1.070 (Bkz. Tablo 5.7.); $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ferulik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.412, % 0.979 ve % 1.362 (Bkz. Tablo 5.8.); $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki ferulik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.309, % 0.405 ve % 0.423 (Bkz. Tablo 5.9.); olarak elde edilen RSD (% , varyasyon katsayısı) değerleri %2'den düşüktür. Ferulik asit'in her bir kesinlik seviyesinde üç tekrarlı çözeltisi için hesaplanan %RSD'nin %2'den az olduğu tespit edildiğinden, yöntemin kesin olduğu sonucuna varılmıştır (Abdelazim vd., 2022).

Doğruluk çalışmasında $4.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $8.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon için sırasıyla 100.008 ± 0.234 , 100.062 ± 0.412 ve 100.021 ± 0.510 olarak elde edilen

geri kazanımlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 5.10.). LOD ve LOQ sırasıyla $0.377 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ve $1.144 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ olarak elde edilmiştir ve uygunluğunu doğrusalılıkta çalışılan en düşük konsantrasyonda daha düşük olması ile kanıtlamıştır (Farid, vd., 2022; Öztürk vd., 2018c).

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde ferulik asit için %1 Tween 80 içeren PBS pH 7.4 ortamında seçici, basit ve ucuz bir yöntem geliştirildiği söylenebilir (Öztürk vd., 2019b; Öztürk vd., 2023b).

6.2. Nanopartikül formülasyonların hazırlanması

Bu çalışmada hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları hazırlamak PLGA (Poli Laktik-ko-Glikolik Asit) kullanılmış ve hazırlama yöntemi olarak nanoçöktürme tekniği tercih edilmiştir. Nanoçöktürme tekniğinin bir diğer ismi çözücü yer değiştirme tekniğidir. Bu teknikte organik solvent su ile karışabilen yarı polar bir solvent ile yer değiştirmesi sonucunda sistemde bulunan polimerin yüzeyler arasında birikimi görülmektedir. Solventin non-solvan faza çok hızlı bir şekilde gerçekleşen difüzyonu ile iki farklı faz arasındaki yüzeyler arası gerilim düşmektedir. Sonuç olarak yüzey alanını artırır ve ufak organik çözücü damlacıklarının oluşumuna yol açar. Nanoçöktürme yöntemi ucuz ve basit bir yöntemdir (Mishra vd., 2010). Bu teknikte ilaç taşıyıcı sistem hazırlamak için seçilen polimer etil asetat, öncelikle dikloro metan veya aseton gibi bir organik çözücü içinde çözündürülür. İlgili polimer çözeltisine ilaç etkin maddesi eklenir ve çözündürülür. Oluşan polimer-ilac çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde ve yüzey etkin madde içeren distile su içerisine belirli hızda damlatılır. Suyun ve özellikle çözücünün oda ısısında veya vakum altında uzaklaştırılması ile nanopartikül süspansiyonun son hacmi gerekli miktara ayarlanır ve liyofilize edilebilir. Nanoçöktürme yönteminde ilaç etkin maddesi içeren nanopartikül formülasyonu hazırlanmadan önce polimere ya da sonrasında nanopartikülün yüzeyine kovalan bağlanması, polimerik taşıyıcı sisteme tutunması veya nanopartikül hazırlanırken etkin maddenin polimerik matris içine hapsedilmesi gibi stratejiler bulunmaktadır (Muthu, 2009). Genellikle ferulik asit gibi hidrofobik ilaçlar için kullanılmakla birlikte hidrofilik ilaçlar içinde uyarlanabilmektedir fakat en popüler kullanım alanı hidrofobik ilaçlar içindir (Akyürek, 2015). Sonuç olarak; PLGA polimeri altın standart olup dünya genelinde popüler bir şekilde kullanılmakta olup, hidrofobik ilaç yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasına en uygun yöntem olan nanoçöktürme yöntemi ise oldukça ekonomik ve

avantajlı metod olup araştırma ve formülasyon aşamasını çıkmaza sokacak herhangi bir basamak içermez.

Bu tez çalışması kapsamında sulu faz içeriğinde bulunan Poloksamer 188 konsantrasyonun ve organik faz içeriğinde bulunan Span 60 konsantrasyonun nanopartikül özellikleri üzerine etkisini incelemek için öncelikle 9 adet blank formülasyon hazırlanmıştır. A-Blank, B-Blank ve C-Blank kodlu formülasyonlarda organik fazda bulunan Span 60 miktarı sırasıyla 25 mg, 30 mg ve 35 mg olarak belirlenmiş ve ilgili formülasyonlarda sulu fazda kullanılan Poloksamer 188 konsantrasyonu %0.5 (*a/h*) olarak tercih edilmiştir. D-Blank, E-Blank ve F-Blank kodlu formülasyonlarda organik fazda bulunan Span 60 miktarı sırasıyla 25 mg, 30 mg ve 35 mg olarak belirlenmiş ve ilgili formülasyonlarda sulu fazda kullanılan Poloksamer 188 konsantrasyonu % 1.0 (*a/h*) olarak tercih edilmiştir. G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlarda organik fazda bulunan Span 60 miktarı sırasıyla 25 mg, 30 mg ve 35 mg olarak belirlenmiş ve ilgili formülasyonlarda sulu fazda kullanılan Poloksamer 188 konsantrasyonu % 1.5 (*a/h*) olarak tercih edilmiştir. Formülasyonların hazırlanması ardından parçacık boyut, parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüş ve optimum blank formülasyona (A-Blank) karar verildikten sonra ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonu (A-FA) hazırlanmıştır.

6.3. Nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

6.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel

Nanopartiküller ve nanopartikül bazlı cihazlar, benzersiz ve genellikle avantajlı özelliklerinden dolayı çok sayıda endüstriyel uygulamada ilgi görmektedir. Nanopartiküllerin boyut etkileri (kuantum etkileri) ile yüksek yüzey-hacim oranı, kimyasal, elektronik, manyetik ve mekanik özellikler gibi boyuta bağlı birçok olguyu ortaya çıkarır (Wang, 2001). Parçacık boyutu, nanopartikül özelliklerinde çok önemli bir rol oynar ve bu nedenle nanopartiküllerin karakterizasyonunda en temel analizlerden biri parçacık boyutu ölçümüdür (Akabri vd., 2011).

Medikal nanopartiküllerin parçacık boyut ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) karmaşık biyolojik ortamlardaki stabilitesi, kalite, güvenlik ve etkililiklerini değerlendirmek için temel özelliklerdir. Dinamik ışık saçılımı (DLS), farmasötik teknolojide medikal nanopartiküllerin en yaygın boyutlandırma tekniğidir (Caputo vd., 2019). Bu çalışmada bu sebeple DLS tekniği tercih edilmiştir. Polimerik

nanopartiküllerde parçacık boyutu ve parçacık boyut dağılımı analizleri özellikle medikal alanda kullanılacak nanopartiküllerin en önemli iki özelliğidir. Bu özellikler ilaç mukoadezyon, salım hızı, biyolojik dağılım, hücresel alım vb. özellikleri ciddi bir şekilde etkilemektedir (Öztürk vd., 2018b).

Parçacık boyut analizlerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında etkin maddesiz hazırlanan A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için sırasıyla 164.83 nm \pm 1.68, 166.17 nm \pm 1.08, 176.10 nm \pm 1.68, 182.33 nm \pm 2.64, 210.40 nm \pm 6.56, 208.9 nm \pm 3.05, 206.13 nm \pm 1.44, 217.3 nm \pm 2.95 ve 188.73 nm \pm 1.08 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.11 ve Şekil 5.9.). Literatür incelendiğinde hem fazla ekspiyan kullanılmaması adına hem de en düşük parçacık boyutuna sahip olması açısından etkin maddesiz formülasyon olarak 164.83 nm \pm 1.68 parçacık boyutuna sahip A-Blank kodlu formülasyon optimum seçilmiştir (Öztürk vd., 2020b; Öztürk vd., 2019c).

Parçacık boyut dağılımı (PDI) sonuçları etkin maddesiz hazırlanan A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için sırasıyla 0.093 \pm 0.008, 0.089 \pm 0.077, 0.111 \pm 0.023, 0.072 \pm 0.027, 0.081 \pm 0.027, 0.144 \pm 0.061, 0.034 \pm 0.016, 0.131 \pm 0.024 ve 0.117 \pm 0.013 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.12 ve Şekil 5.10.). Parçacık boyutu dağılımını karakterize etmeyle ilgili olarak, nano-taşıyıcı sistemlerin boyut aralığını tanımlamak için kullanılan bir parametreye "polidispersite indeksi" (PDI) denir. "Polidispersite" (veya IUPAC tarafından önerildiği şekliyle "dağılma") terimi, parçacıkların boyut dağılımının tekdüze olma derecesini tanımlamak için kullanılır (Danaei vd., 2018). Heterojenlik indeksi olarak da bilinen PDI, korelasyon verilerine (kümülant analizi) iki parametrelili bir uyumdan hesaplanan bir sayıdır. Bu indeks boyutsuzdur ve 0.05'ten küçük değerler esasen yüksek düzeyde tek dağılımlı standartlarda görülecek şekilde ölçeklenmiştir. 0.7'den büyük PDI değerleri, numunenin çok geniş bir parçacık boyutu dağılımına sahip olduğunu ve muhtemelen dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği ile analiz edilmeye uygun olmadığını gösterir (Worldwide, 2011). Hazırlanan nanopartiküllerin PDI değerlerinin optimum değer olarak kabul etmesi için 0.3'ten küçük olması gerekmektedir fakat 0.5'ten küçük değerler de kabul edilebilir olduğu literatürde bildirilmiştir (Büyükköroğlu vd., 2016; Şenel ve Öztürk, 2019). Literatür ışığında, sonuç olarak bu tez kapsamında hazırlanan tüm blank PLGA nanopartiküllerinin kaliteli ve monodispers olarak hazırlandığı sonucuna varılabilir. 164.83 nm \pm 1.68 parçacık boyutuna sahip A-Blank kodlu

formülasyonunun 0.093 ± 0.008 olan PDI değeri ilgili formülasyonun optimum olarak seçilmesinin bir diğer nedenidir.

A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.11., Şekil 5.12., Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18. ve Şekil 5.19.'da sunulan Zetasizer Nano ZS cihazından alınan parçacık boyut dağılım raporları ise tez çalışmasında hazırlanan formülasyonların monodispersliğini kanıtlar niteliktedir.

Bu çalışmada hem antioksidan aktivite hem de anti-alzheimer aktivite hedeflenmiştir. Nanopartiküllerin kan beyin bariyerini geçebilmesi özellikle alzheimer tedavisinde oldukça önemlidir. Literatür incelendiğinde parçacık boyutu 250 nm'den daha düşük parçacık boyutunun kan beyin bariyeri geçişi için önemli bir özellik olduğu vurgulanmıştır (Pinheiro vd., 2020). Başka bir çalışmada ise parçacık boyunun 150 nm civarında olması vurgulanmıştır (Revdekar ve Shende, 2021). Bu bilgiler doğrultusunda en düşük parçacık boyutuna sahip A-Blank kodlu formülasyon ile çalışmaya karar verilmiştir.

Bu tez çalışmasında hazırlanan tüm blank nanopartikül formülasyonları için negatif zeta potansiyel sonuçları gözlemlenmiştir. Zeta potansiyel sonuçları A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için $-18.87 \text{ mV} \pm 0.15$, $-25.27 \text{ mV} \pm 0.57$, $-25.63 \text{ mV} \pm 0.38$, $-23.55 \text{ mV} \pm 0.07$, $-26.77 \text{ mV} \pm 0.72$, $-27.23 \text{ mV} \pm 0.49$, $-28.80 \text{ mV} \pm 0.06$, $-25.67 \text{ mV} \pm 0.80$ ve $-27.20 \text{ mV} \pm 0.17$ olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.13. ve Şekil 5.20). A-Blank, B-Blank, C-Blank, D-Blank, E-Blank, F-Blank, G-Blank, H-Blank ve I-Blank kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.21., Şekil 5.22., Şekil 5.23., Şekil 5.24., Şekil 5.25., Şekil 5.26., Şekil 5.27., Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.'da Zetasizer Nano ZS cihazından alınan zeta potansiyel sonuç raporları negatif zeta potansiyel dağılımını kanıtlar niteliktedir. Nötr bir ortamda bulunan PLGA polimeri, yapısında bulunan terminal karboksil grupları nedeniyle negatif yüzey potansiyeline sahiptir ve PLGA'nın bu özelliği hazırlanan formülasyonlarda elde edilen negatif zeta potansiyeli değerlerini açıklar niteliktedir (Lima vd., 2018). Medikal nanopartikül sisteminde elde edilen -5.0 ve -15.0 mV arasındaki zeta potansiyel değerleri nanopartikül sistemin flokülasyonun sınır bölgesinde olduğunu göstermekte olup ve -5.0 ile -3.0 mV arasındaki değerler bir nanosistem için ise maksimum flokülasyon bölgesi olduğu daha önce bildirilmiştir (Müller vd., 2000). Bu bilgi ışığında optimum olarak seçilen A-Blank kodlu formülasyonun $-18.87 \text{ mV} \pm 0.15$

olarak elde edilen zeta potansiyel değeri sayesinde nispeten kararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

A-Blank kodlu etkin maddesiz formülasyon optimum seçildikten sonra etkin maddeli formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel sonuçları sırasıyla $174.70 \text{ nm} \pm 0.89$, 0.113 ± 0.006 ve $-22.00 \text{ mV} \pm 0.56$ olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.14., Şekil 5.30. ve Şekil 5.31.). Bu veriler ışığında ilk göze çarpan nokta etkin maddeli hazırlanan formülasyonda parçacık boyutunda artışın tespit edilmesidir. Literatüre göre, etkin madde enkapsüle edilmiş nanosistemlerde parçacık boyutunun etkin maddesiz blank formülasyonlardan daha fazla olabileceği vurgulanmıştır. Bu durum polimer gibi büyük moleküllü yapıların ilaç etkin maddesini enkapsülleyerek nanopartikül sistem meydana getirmesi ve böylece hazırlanan nanopartikül partikül boyutunda artış olabilmesi olarak aydınlatılmıştır (Ekambaram ve Abdul, 2011; Öztürk vd., 2019a). Tüm çalışma sonucunda ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu optimum olarak seçilmiş ve geri kalan tüm çalışmalara A-FA kodlu formülasyon ile devam edilmiştir.

6.3.2. Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi

Dondurarak kurutma, koloidal nanopartiküllerin uzun vadeli stabilitesini geliştirmek için iyi bir teknik olarak kabul edilmiştir. Bu sistemlerin sulu ortamdaki zayıf stabilitesi, nanopartiküllerin klinik kullanımına karşı gerçek bir engel oluşturmaktadır (Abdelwahed vd., 2006). Nanopartiküller sulu ortamda saklandığında neredeyse tüm avantajlarını kaybetip fiziksel instabilite (agregasyon/partikül füzyonu) ve/veya kimyasal instabilite (nanopartikülleri oluşturan polimer malzemelerin hidrolizi, nanopartiküllerden ilaç sızıntısı ve depolama sırasında ilacın kimyasal reaktivitesi) gibi dezavantajlarla karşılaşmaktadır (Chacón vd., 1999; Auvillain vd., 1989). Bu sebeple ortamdan suyun uzaklaştırılması gerekmektedir.

Liyofilizasyon işleminde nanopartikül formülasyonunu kuruma stresinden (liyoprotektan) veya donma stresinden (kriyoprotektan) etkilenmesini engellemek ve ayrıca depolama sırasında stabilitesini artırmak için bazı özel ajanlar ilave edilmektedir. Literatürde dondurularak kurutulan nanopartiküller için kullanılan en popüler kriyoprotektanlar şeker türevleridir. Trehaloz, sükroz, glikoz ve manitol bu ajanlara örnek olarak verilebilir (Abdelwahed vd., 2006).

Bu tez kapsamında optimum olarak seçilen A-FA kodlu formülasyonun dondurma (Bkz. Tablo 5.15., Şekil 5.32 ve Şekil 5.33.) ve kurutma (Bkz. Tablo 5.17., Şekil 5.35 ve Şekil 5.36.) aşamalarından sonra parçacık boyutunun değişimini önlemek için farklı konsantrasyonlarda trehaloz çözeltisi bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışma kapsamında taze hazırlanan ve santrifüje edilen partiküllerin yıkama proseslerinin ardından üzerine % 5.0 (*a/h*) konsantrasyonunda hazırlanan trehaloz çözeltisinden 1 mL eklenip vortekslenmiş ve 12 eşit kısma ayrılmış ve bu tüplere sırasıyla % 5.0 *a/h* konsantrasyondaki trehaloz çözeltisinden 1. tüpe 0 µL, 2. tüpe 100 µL, 3. tüpe 200 µL, 4. tüpe 300 µL, 5. tüpe 400 µL, 6. tüpe 600 µL, 7. tüpe 750 µL, 8. tüpe 900 µL, 9. tüpe 1050 µL, 10. tüpe 1300 µL, 11. tüpe 1450 µL ve 12. tüpe 1600 µL eklenmiştir. Tüm tüpler - 20°C’de buzdolabında dondurulmasının ardından liyofilizatörde liyofilize edilmiştir.

Liyofilizasyon sonucu, liyofilize toz nanopartikül formülasyonlarının üzerine 1 mL distile su eklenip vortekslenerek dağıtılmıştır. Her tüp için parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. 0 µL trehaloz çözeltisi, 100 µL trehaloz çözeltisi, 200 µL trehaloz çözeltisi, 300 µL trehaloz çözeltisi, 400 µL trehaloz çözeltisi, 600 µL trehaloz çözeltisi, 750 µL trehaloz çözeltisi, 900 µL trehaloz çözeltisi, 1050 µL trehaloz çözeltisi, 1300 µL trehaloz çözeltisi, 1450 µL trehaloz çözeltisi ve 1600 µL trehaloz çözeltisi eklenen tüplerde liyofilizasyon sonrası elde edilen parçacık boyutları sırasıyla 532.50 nm ± 3.48, 361.47 nm ± 10.89, 350.47 nm ± 4.97, 288.43 nm ± 7.21, 267.50 nm ± 7.10, 239.47 nm ± 10.20, 238.60 nm ± 6.95, 252.03 nm ± 2.86, 205.80 nm ± 0.97, 187.62 nm ± 2.34, 174.33 nm ± 1.27 ve 174.06 nm ± 2.04 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.17. ve Şekil 5.35.). Bu sonuçlar doğrultusunda 1450 µL trehaloz çözeltisinin dondurarak kurutma işleminden sonra parçacık boyutunun sabit tutulması için yeterli olduğuna karar verilmiştir. 1450 µL trehaloz çözeltisinin eklendiği analizde parçacık boyut dağılımı değerlerinin (Bkz. Tablo 5.17. ve Şekil 5.35.) ve zeta potansiyel değerlerinin (Bkz. Tablo 5.18. ve Şekil 5.37.) taze formülasyonun değerlerine benzer olması 1450 µL trehaloz çözeltisinin kullanılmasının taze formülasyonun özelliklerinin değişmemesi için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

6.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme

Kısa süreli gastrointestinal kararlılık ve *In vitro* salım profillerinin daha iyi anlaşılması için tez kapsamında optimum olarak seçilen A-FA kodlu formülasyonun stabilitesi farklı gastrointestinal ortamlarda 37 °C’de analiz edilmiştir. Bu analizler 24 saat

boyunca pH 1.2 HCl tamponu, pH 6.8 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu ve distile su içinde gerçekleştirilmiştir. PLGA gibi hidrolitik bozunabilir polimerlerden oluşan nanopartikül sistemlerin zamanla bozunduğu bilinmektedir. Sıcaklık ve pH'ın ilaçların uzun süreli stabilitesi üzerinde çok önemli etkileri olduğu bildirilmiştir (Öztürk vd., 2018).

Yapılan analizler sonuçları incelendiğinde (Bkz. Tablo 5.19. ve Şekil 5.38.) pH 6.8 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu ve distile su içinde bulunan nanopartiküllerin parçacık boyutlarının daha yavaş ve az arttığı tespit edilmiştir. Öte yandan pH 1.2 HCl tamponunda bulunan nanopartiküllerin parçacık boyutu sıfırıncı zamana göre daha çok artmış ve 24. saatin sonunda 419.7 ± 34.2 değeri elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında hazırlanan A-FA kodlu nanopartikül formülasyonun pH 1.2 HCl tamponunda hızlı degradasyonla ve diğer ortamlarda yavaş degradasyonla parçalandığı sonucuna varılabilir (Öztürk vd., 2019a; Öztürk vd., 2019b).

6.3.4. Enkapsülasyon etkinliği

Bu tez kapsamında hazırlanan A-FA kodlu formülasyonun enkapsülasyon etkinliği $\%76.48 \pm 3.12$ olarak elde edilmiştir. A-FA kodlu formülasyon için elde edilen yüksek ve ideal % EE değerleri, ferulik asitin su fazına olan düşük afinitesi ve böylece organik faza geç etme eğiliminde olan lipofilik kimyasından dolayı olduğu şeklinde açıklanabilir (Durán-Lobato vd., 2015). Yüksek % EE belirli bir doz için daha düşük miktarda nanopartikülün hastaya uygulanma avantajını sağlar (Martín-Banderas vd., 2012; Panyam vd., 2004). Literatüre göre enkapsülasyon etkinliği için elde edilen $\%76.48 \pm 3.12$ değeri oral uygulama için ideal olduğu söylenebilir.

6.3.5. In vitro dissolüsyon

Ferulik asit ile ilgili literatüre girmiş daha önceki çalışmalarda yüzey etkin madde içeren ve içermeyen pH 7.4 PBS ortamının salım ve dissolüsyon ortamı olarak seçildiği görülmüştür (Srinivasan vd., 2007; Mota vd., 2008). Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen gastrointestinal stabilite değerlendirme çalışması ve literatür bilgisi ışığında dissolüsyon testinin % 1.0 Tween 80 içeren pH 7.4 PBS ortamında yapılmasına karar verilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan dissolüsyon testinde saf ferulik asit, % 1.0 Tween 80 içeren pH 7.4 PBS ortamında birinci saatin sonunda $\% 89.3 \pm 7.9$, ikinci saatin sonunda ise $\% 98.2 \pm 1.3$ salım oranı göstermiştir. Üçüncü saatin sonunda $\% 99.6 \pm 0.3$ salım

oranı ile ferulik asitin neredeyse tamamı % 1.0 Tween 80 içeren pH 7.4 PBS ortamında salınmıştır (Bkz. Tablo 5.20. ve Şekil 5.39).

Ferulik asit içeren A-FA kodlu nanopartikül formülasyonundan ferulik asit salım oranlarına bakıldığında 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12 ve 24. saatlerin sonunda sırasıyla % 10.5 ± 4.3 , % 20.4 ± 5.6 , % 27.6 ± 2.7 , % 33.8 ± 4.6 , % 35.6 ± 3.3 , % 40.9 ± 6.6 , % 44.8 ± 5.2 , % 48.7 ± 5.1 , % 51.1 ± 4.2 ve % 68.9 ± 4.9 değerleri elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.20. ve Şekil 5.39). Literatüre incelendiğinde A-FA kodlu nanopartikül formülasyonundan ferulik asit salımı saf ferulik asit ile karşılaştırıldığında, A-FA kodlu nanopartikül formülasyonun daha yavaş ve 24 saatlik bir uzatılmış salım yaptığı oldukça açıktır (Raman vd., 2022; Senthil Kumar vd., 2020).

6.3.6. Salım Kinetiği

Dissolüsyon testi sonucunda elde edilen salım verileri ve kümülatif salım profilleri belirlendikten sonra, salım kinetiğinin aydınlatılması açısından çok önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için tüm dissolüsyon verileri DDSolver programına aktarılmıştır. Bu önemli dört kriter korelasyon katsayısı (r^2), düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$), Model seçme kriteri (MSC) ve Akaike bilgi kriteri (AIC)'dir. Değerlendirmede en yüksek r^2 , $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değeri baz alınmıştır. Programda Sıfırıncı-derece, Sıfırıncı-derece (T_{lag}), Sıfırıncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri incelenmiştir (Zhang vd., 2010; Zuo vd., 2014).

A-FA kodlu nanopartikül formülasyonundan ferulik asit salım kinetiğinin Peppas-Sahlin ve Weibull modelleri için çok benzer olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 5.21.). Başka bir deyişle, Peppas-Sahlin modeli ve Weibull modeli arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmanın sonuçları nanopartiküllerden, ferulik asit salımının tek bir mekanizmayla değil, Fickian (saf difüzyon fenomeni) ve Fickian olmayan salım (nanopartiküller arasındaki polimer zincirlerinin gevşemesi) ile esas olarak kontrol edildiğini göstermektedir. Literatür incelendiğinde benzer sonuçlara rastlanmaktadır (Yang vd., 2019).

6.4. Katı hal karakterizasyonları

6.4.1. Termal analiz

Formülasyonlar için termal geçiş profilini gösteren DSC termogramlarından enkapsülleme işleminin başarılı yapıldığına yönelik kanıtlar çıkarılabilir (Panwar vd., 2016). Bu amaçla bu tez çalışması kapsamında saf ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu boş formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için termal analiz incelenmiş ve DSC eğrileri/termogramları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.67.-5.71). Saf ferulik asit sırasıyla 172.66°C'de erime piki sergilemiştir (Bkz. Şekil 5.67.). Literatür incelendiğinde bu karakteristik endotermik erime piki ferulik asit için uygundur (Romeo vd., 2021) A-Blank (Bkz. Şekil 5.69.) ve A-FA (Bkz. Şekil 5.70) kodlu formülasyonlarda endotermik tepe noktası /erime noktası sırasıyla 49.22°C ve 50.94°C'de gözlenmiştir, bu pikler PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığının bir göstergesidir (Öztürk vd., 2019c). Fiziksel karışımında ise hem ferulik asitin karakteristik erime pikleri hem de PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığına ait pikler gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5. 71). Ferulik asit'in erime pikinin A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun termogramında kaybolması, ferulik asitin amorf durumda enkapsüle edildiğini ve polimerik yapı içinde moleküler olarak dağıldığını göstermiştir (Bkz. Şekil 5.70.) (Abdelghany vd., 2019; Yurtdaş Kirimlioğlu ve Öztürk, 2020). Ayrıca termogram, ferulik asitin ve polimerler arasında bir etkileşim olmadığını göstermiştir. Elde edilen bu veriler önemlidir, çünkü ilacın moleküler dispersiyon formundaki varlığı uzatılmış salım özelliğine yardımcı olur (Bkz. Şekil 5.70.) (Nair vd., 2011).

6.4.2. FT-IR analizleri

Bu tez çalışması kapsamında enkapsülasyonu ve kimyasal etkileşimleri belirlemek için saf ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu boş formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için FT-IR analiz incelenmiş ve FT-IR spektrumları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.72.-Şekil 5.76.) Saf ferulik asit, -OH gerilme titreşimleri için tipik olan 3435.22 cm⁻¹'de bir tepe noktası göstermiştir. 3014.74 cm⁻¹ civarındaki absorpsiyon bantları, alkan gruplarının varlığına karşılık gelmektedir. C=O karbonil grubu için 1687.71 cm⁻¹'deki bant ve C-O grubu için 1265.30 cm⁻¹'deki bant gözlenmiştir. 1598.99 cm⁻¹ ve 1508.33 cm⁻¹'deki sinyaller aromatik halkanın titreşimiyle ilişkiliyken, 1200.00 cm⁻¹ etrafındaki tepe C-OH esnemesi için tipiktir ve son olarak

1033.85 cm^{-1} 'deki bant metoksit O-CH₃ gerilmesi için tipiktir. Bu veriler doğrultusunda saf ferulik asitin FT-IR spektrumu literatür ile uygun bulunmuştur (Bkz. Şekil 5.72.) (Merlin vd., 2012; Panwar vd., 2016). PLGA'nın spektrumu incelendiğinde PLGA'a ait karakteristik absorpsiyon bantları farkedilmiştir. 3346.50 cm^{-1} 'deki bantlar hidroksil grupları için tipik olup 2999.31 cm^{-1} 'deki bantlar C-H alkan grupları için titreşime karşılık gelmektedir. C=O karbonil grubu için karakteristik gerilme tepe noktaları 1753.29 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1300 ile 1400 cm^{-1} arasındaki bantlar C-H alkan gruplarının eğilme titreşimi için olup, 1271.09 cm^{-1} ile 1089.78 cm^{-1} arasındaki bölgedeki bantlar ise C-O titreşimi için karakteristiktir. Bu veriler doğrultusunda PLGA'nın FT-IR spektrumu literatür ile uygun bulunmuştur (Bkz. Şekil 5.73.) (Romeo vd., 2021).

Etkin maddesiz A-Blank kodlu formülasyonun FT-IR spektrumu PLGA ile benzer olarak elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.74.). Fiziksel karışımda ise hem ferulik asit'e hem de PLGA'a ait karakteristik pikleri gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.76). DSC sonuçlarında desteklediği gibi polimerik matrislerde ferulik asitin moleküler dağılımını gösteren, A-FA kodlu ferulik asit yüklü nanopartikül formülasyonunun spektrumlarında belirgin ferulik asit piklerinde belirgin azalma görülmüştür ve bu durum ferulik asitin polimerik yapı içinde enkapsülasyonunu doğrulamıştır (Bkz. Şekil 5.75.) (Gamisans vd., 1999; Vega vd., 2008).

6.4.3. ¹H-NMR analizleri

Bu tez çalışması kapsamında saf ferulik asit, PLGA, A-Blank kodlu boş formülasyon, ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için ¹H-NMR analiz incelenmesi yapılmış ve ¹H-NMR spektrumları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.77-5.81). Ferulik asit ile yapılan bir çalışmada ferulik asit'e ait spesifik pikler 7.49 ppm, 7.20 ppm, 7.08 ppm, 6.69 ppm, 6.37 ppm ve 3.82 ppm'de gözlemlendiği vurgulanmıştır (Narayanan vd., 2020). Ferulik asite ait ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde literatür ile uygun bulunmuştur (Bkz. Şekil 5.77.). Bu tez çalışmasında etkin maddesiz hazırlanan blank formülasyonun (A-Blank) ¹H-NMR analizinden elde edilen spektrumun, saf polimerin (PLGA) spektrumu ile benzerlik göstermiş ve ferulik asite ait spesifik piklerin geldiği ppm noktaları ve aralıklarında bir pike rastlanmamıştır (Öztürk vd., 2019c). Etkin maddeli hazırlanan A-FA kodlu formülasyonda ferulik asite ait karakteristik pikler gözlemlenmiş fakat yoğunluk azalmıştır (Bkz. Şekil 5.80.). Ferulik asitin moleküler dağılımı ve konsantrasyon ile orantılı olarak az yoğunluklu karakteristik ppm değerlerinde pik

vermesi ferulik asitin moleküler olarak polimerik yapının içinde dağıldığı düşünülmüştür. Bu durum aynı zamanda ferulik asitin başarılı bir şekilde nanopartiküllere yüklendiği şeklinde yorumlanmıştır (Şenel ve Öztürk, 2019).

6.5. Biyolojik aktivite çalışmaları

Ferulik asitin antioksidan etkisi, bağırsak iskemisi, kanser, kardiyovasküler ve cilt hastalıkları, diyabet, tekrarlayan gürültüye maruz kalmaya bağlı koklear oksidatif hasar ve insan dermal fibroblastlarında oksidatif hücrel stres gibi çeşitli akut ve kronik patolojilere karşı doğrulanmıştır. Ayrıca, FA'nın serbest radikal süpürme aktivitesi, özellikle Alzheimer hastalığı olmak üzere çeşitli nörodejeneratif patolojilere karşı test edilmiştir (Sgarbossa vd., 2015).

Tıp alanındaki çeşitli bulgular, serbest radikal üretimi ile ilişkili bir dizi hastalığın başlangıcını bildirmektedir. Oksidatif stres, serbest radikaller olarak adlandırılan reaktif moleküllerin vücutta biriktiği ve oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir bu durum sağlıksız yaşam tarzları, kmyasal maruziyeti, kirlilik, sigara, uyuşturucu kullanımı, bazı hastalıklar ve stres gibi çeşitli faktörlerle ilişkilidir. Oksijen, çeşitli biyolojik olaylarda hayati bir rol oynar, ancak oksidatif olaylarla hücre içi hasarı da yoğunlaştırabilir. Oksijen ana enerji kaynağıdır ve mitokondri tarafından üretilen adenzin trifosfatın (ATP) bir sonucu olarak serbest radikaller oluşur. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS), hücrel redoks süreçleriyle elde edilen ana ürünlerdir. Hücrelerin içindeki hassas dengelerine bağlı olarak, bu reaktif türler faydalı veya toksik bileşikler olabilir. Düşük veya orta seviyelerde, reaktif türler hücrel redoks sinyali ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde yararlı etkiler gösterirken yüksek konsantrasyonlarda oksidatif stres üretebilir ve hücrel fonksiyon ve yapılarına zarar verebilecek zararlı bir süreç neden olabilir. Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyebilen ve hücrel redoks dengesini koruyabilen oksidatif strese neden olan hasar insidansını azaltmaya yardımcı olan maddedir (Di Carlo vd., 2012; Chauhan V. ve Chauhan A. 2006). Antioksidanların eksojen tüketiminin insan sağlığı üzerinde yararlı etkiler üretebileceğini ve nörodejeneratif bozukluklar da dahil olmak üzere serbest radikal kaynaklı hastalıkların insidansını azaltmada etkili olduğunu bilinmektedir (Sgarbossa vd., 2015). Oksidatif stresin alzheimer nöropatolojisine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Markesbery, 1997). Bu sebeple bu çalışma kapsamında hazırlanan A-FA kodlu nanopartikül

formülasyonu ile hem antioksidan aktivite çalışmaları hem de anti-alzheimer etkinlik çalışmaları yapılmıştır.

Antioksidan aktivite sonuçlarına göre ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu kuvvetli DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} katyon renksizleştirici ve redükleyici antioksidan aktivite göstermiştir (Bkz. Tablo 5.22., Tablo 5.23., Tablo 5.24.)

AChE ve BChE inhibisyonu, beyinde β - amiloit birikimini azaltmak ve asetilkolin kullanımını arttırmak suretiyle Alzheimer hastalığının etkili tedavisinde hedeftir (İlhamEröz vd., 2021). Bu tez kapsamında hazırlanan A-FA kodlu optimum formülasyonun alzheimer hastalığında kullanılma potansiyelinin araştırılması için AChE inhibitör etki ve BChE inhibitör etki çalışmaları yapılmıştır. AChE inhibitör etki çalışmasında ferulik asit yüklü A-FA kodlu formülasyon IC₅₀ değeri 121.65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak elde edilmiş olup BChE inhibitör etki çalışmasında IC₅₀ değeri 419.46 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak anti-alzheimer aktivite sonuçlarına göre asetilkolinesteraz inhibitörü olan Donepezil HCl ile karşılaştırıldığında A-FA kuvvetli anti-AChE aktivite göstermiştir (Bkz. Tablo 5.25. ve Tablo 5.26.).

Oksidatif stres nedeniyle oluşan serbest radikallerin beyinde nöron ve metal akümülyasyonuna verdiği hasar alzheimer patojeneziyle doğrudan ilişkilidir. Alzheimer'e karşı kullanılan terapötik bir ajanın hem AChE inhibitörü, hem de antioksidan özelliğe sahip olması tedavide önem taşımaktadır (İlhamEröz vd., 2021).

7. SONUÇ

Antioksidan özelliğe sahip maddelerin birçok hastalık ve özellikle alzheimer hastalığı tedavisinde olumlu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında ferulik asit yüklü PLGA bazlı nanopartiküller ‘nanoçöktürme’ yöntemi ile hazırlanmış ve sulu faz içeriğinde bulunan Poloksamer 188 konsantrasyonun ve organik faz içeriğinde bulunan Span 60 konsantrasyonun nanopartikül özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Artan Poloksamer 188 ve Span 60 konsantrasyonu parçacık boyutunda artma tespit edilmiştir. Tespit edilen nokta ve fazla ekspan kullanılmaması adına A-Blank kodlu formülasyon optimum seçilmiş ve ferulik asit yüklü hali hazırlanmıştır. Ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonunun parçacık boyutu $174.70 \text{ nm} \pm 0.89$ olarak elde edilmiş ve 0.113 ± 0.006 PDI değeri ile formülasyonun monodispers olduğu kanıtlanmıştır. Zeta potansiyel değeri $-22.00 \text{ mV} \pm 0.56$ elde edilmiş ve uzun süre kararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. A-FA kodlu formülasyonun üzerine trehaloz etkisi değerlendirilmiş ve saklama koşulları ortaya çıkmıştır. Gastrointestinal sıvılarda yapılan 24 saatlik stabilite testinde ise A-FA kodlu formülasyonun asidik ortamlarda daha hızlı degrade olduğu sonucuna varılmıştır. Ferulik asitin su fazına olan düşük afinitesi ve böylece organik faza göç etme eğiliminde olmasından dolayı yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiş ve kapsülleme verimliliği $\%76.48 \pm 3.12$ olarak elde edilmiştir. A-FA kodlu nanopartikül formülasyonundan ferulik asit salımı saf ferulik asit ile karşılaştırıldığında, A-FA kodlu nanopartikül formülasyonun daha yavaş ve 24 saatlik bir uzatılmış salım yaptığı belirlenmiştir. DDSolver ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda Peppas-Sahlin modeli ve Weibull modeli arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir ve salım kinetikleri spesifik tek bir mekanizma ile değil, Fickian ve Fickian olmayan birleşik bir mekanizma tarafından oluştuğu sonucuna ulaşılmıştır. DSC, FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ile enkapsülasyon kanıtlanmıştır. A-FA kodlu formülasyon farmasötik teknoloji açısından karakterize edildikten sonra biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite sonuçlarına göre ferulik asit yüklü A-FA kodlu nanopartikül formülasyonu kuvvetli DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} katyon renksizleştirici ve redükleyici antioksidan aktivite göstermiştir. Anti-alzheimer aktivite sonuçlarına göre asetilkolinesteraz inhibitörü olan Donepezil HCl ile karşılaştırıldığında A-FA kuvvetli anti-AChE aktivite göstermiştir. Alzheimer’e karşı kullanılan terapötik bir ajanın hem AChE inhibitörü hem de antioksidan özelliğe sahip olması tedavide önem taşıdığından bu tez çalışmasında hazırlanan formülasyonun hem oksidatif stres kaynaklı hastalıkların

hem de alzheimer tedavisinde umut vadettiği sonucuna varılmıştır. Çalışmanın ileriki aşamalarında A-FA kodlu formülasyonun uzun süreli kararlılık testleri, kan beyin engeli geçiş çalışmaları, anjiyogenez çalışmaları, farklı bir taşıyıcı sisteme eklenmesi ve farklı *in vivo* alzheimer modelleri ile karakterizasyonu planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdelazim, Ahmed H., Sherif R., Ahmed M. A., ve Mohammed S. (2022). “Comparative evaluation of different mathematical models for simultaneous UV spectrophotometric quantitative analysis of velpatasvir and sofosbuvir”. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 267:120536.
- Abdelghany, Sharif, Thaigarajan P., Angel P., Ben R., Patricia T., Kristina J., Warwick J. B., ve Hak-Kim Chan. (2019). “Alginate modified-PLGA nanoparticles entrapping amikacin and moxifloxacin as a novel host-directed therapy for multidrug-resistant tuberculosis”. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 52:642–51.
- Abdelwahed, Wassim, Ghania D., Stainmesse S., ve Fessi H. (2006). “Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(15):1688–1713.
- Akabri, B., Tavandashti P. M., ve Zandrahimi M. (2011). “Particle size characterization of nanoparticles - A practical approach”. *Iranian Journal of Materials Science and Engineering* 8(2):48–56.
- Akyürek, Y. (2015). Akut Omurilik Travmalarında Kullanılmak Üzere Nöroprotektif İlaç Yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi. Yayımlanmış Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Almoustafa, Hassan A., Mohammed A. A., ve Chik Z.. (2017). “Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method”. *International Journal of Pharmaceutics* 533(1):275–84.
- Amatya, Sarmila, Park E. J., Park J. H., Kim J. S., Eunyoung S., Lee H., Choi H., Shin Y. H., ve Na D. H. (2013). “Drug release testing methods of polymeric particulate drug formulations”. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 43(4):259–66.
- Araújo, Larissa B. D. C., Sarah L. S., Marcos A. M. Galvão, Magda R. A. Ferreira, Evani L. A., Karina P. R., ve Luiz A. L. S. (2013). “Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry”. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23(5):736–42.

- Atak, Eylem, ve Uslu M. E. (2017). "Fenolik bileşiklerin enkapsülasyonu". *M C B Ü Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi* 24(2):82–92.
- Athar, Mohd, ve Amar Das. (2014). "Therapeutic nanoparticles: State of The Art of nanomedicine". *Advanced Materials Review* 1:25–37.
- Auvillain M., Cavé G., Fessi H., and Devissaguet J. P. (1989). "Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques". *STP pharma* 5(11):738–44.
- Baghirova L., Kaya Tilki E., ve Öztürk A. A. (2023). "Evaluation of Cell Proliferation and Wound Healing Effects of Vitamin A Palmitate-Loaded PLGA/Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles: Preparation, Characterization, Release, and Release Kinetics". *ACS Omega* 8(2):2658–68.
- Bairagi, Ujjawal, Mittal P., Singh J., ve Mishra B. (2018). "Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing". *Drug Development and Industrial Pharmacy* 44(11):1783–96.
- Barone, Eugenio, Calabrese V., ve Mancuso C. (2009). "Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases". *Biogerontology* 10(2):97–108.
- Başaran E., Öztürk A.A., Şenel B., Demirel M., ve Sarıca Ş. (2022). "Quercetin, Rutin And Quercetin-Rutin Incorporated Hydroxypropyl β -Cyclodextrin Inclusion Complexes". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 172:106153.
- Berkowitz, Steven A., John R. E., Mazzeo J.R., ve Graham B. J. (2012). "Analytical Tools for Characterizing Biopharmaceuticals and the Implications for Biosimilars." *Nature Reviews. Drug Discovery* 11(7):527–40.
- Bhardwaj, Upkar, ve Burgess D. J. (2010). "A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems". *International Journal of Pharmaceutics* 388(1):287–94.
- Borman P., ve Elder D. (2017). "Q2(R1) Validation of Analytical Procedures". 127–66 içinde *ICH Quality Guidelines*.
- Bretnall A. E., ve Clarke G. S. (2011). "11 - Validation of Analytical Test Methods". Ss. 429–57 içinde *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. C. 10, editör S. Ahuja ve S. B. T.-S. S. and T. Scypinski. Academic Press.
- Büyükköroğlu G., Şenel B., Başaran E., Yenilmez E., ve Yazan Y. (2016). "Preparation

- and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 109:174–83.
- Caputo, F., Clogston J., Calzolari L., Rösslein M., ve Prina-Mello A. (2019). “Measuring Particle Size Distribution of Nanoparticle Enabled Medicinal Products, the Joint View of EUNCL and NCI-NCL. A Step by Step Approach Combining Orthogonal Measurements with Increasing Complexity.” *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 299:31–43.
- Di Carlo M., Giacomazza D., Picone P., Nuzzo D., ve San Biagio P. L. (2012). “Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases?” *Free Radical Research* 46(11):1327–38.
- Chacón M., Molpeceres J., Berges L., Guzmán M., ve Aberturas M. R. (1999). “Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L-lactide-glycolide) carriers”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 8(2):99–107.
- Chakravarty P., Famili A., Nagapudi K., ve Al-Sayah M. A. (2019). “Using Supercritical Fluid Technology as a Green Alternative During the Preparation of Drug Delivery Systems”. *Pharmaceutics* 11(12), 629.
- Chauhan V., Chauhan A. (2006). “Oxidative stress in Alzheimer’s disease”. *Pathophysiology* 13(3):195–208.
- Choi J. H., Park J. K., Kim K. M., Lee H. J., ve Kim S. (2018). “In vitro and in vivo antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid”. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 32(1):1–8.
- Choi R., Kim B H., Naowaboot J., Lee M. Y., Hyun M. R., Cho E. J., Lee E. S., Lee E. Y., Yang Y. C., ve Chung C. H. (2011). “Effects of Ferulic Acid on Diabetic Nephropathy in a Rat Model of Type 2 Diabetes.” *Experimental & Molecular Medicine* 43(12):676–83.
- Çobanoğlu E., ve Şenel S. (2023). “An Overview of In Vitro Release Test Methods Used In The Study of Nanoparticulate Drug Delivery Systems”. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 43(1):78–98.
- Dagron S. (2014). “Die International Conference on Harmonization of Technical

- Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) BT - Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen". Ss. 541–45 içinde, editör C. Lenk, G. Duttge, ve H. Fangerau. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Danaei M., Dehghankhold M., Ataei S., Davarani F. H., Javanmard R., Dokhani A., Khorasani S., ve Mozafari M. R. (2018). "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems." *Pharmaceutics* 10(2).
- Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Breton A. L. ve Pr eat V. (2012). "PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications". *Journal of Controlled Release* 161(2):505–22.
- Derman vd., Kızılbey K. (2013). "Polymeric nanoparticles". *Journal* 31(1):107–20.
- Durán-Lobato M., Martín-Banderas L., Gonçalves L. M. D., Fernández-Ar evalo M., ve Almeida A. J. (2015). "Comparative study of chitosan- and PEG-coated lipid and PLGA nanoparticles as oral delivery systems for cannabinoids". *Journal of Nanoparticle Research* 17(2).
- Ekambaram P., ve Abdul H. S. A. (2011). "Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Ramipril." *Journal of Young Pharmacists : JYP* 3(3):216–20.
- Emrah  . (2014). Etkin madde y kl  plga nanopartiküllerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. Erzurum: *Atat k  niversitesi, sağlık bilimleri enstit s .*
- Farid J. F., Nadia M. M., Fayez Y. M., Essam H. M., ve ElTanany B. M. (2022). "Chemometric quality assessment of Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride with Paracetamol impurities; comparative UV-spectrophotometric implementation of four predictive models". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 265:120308.
- Gamisans F., Lacoulonche F., Chauvet A., Espina M., García M. L., ve Egea M. A. (1999). "Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods". *International Journal of Pharmaceutics* 179(1):37–48.
- Gohil K. J., Kshirsagar S. B., ve Sahane R. S. (2012). "Ferulic Acid-a Comprehensive Pharmacology of an Important Bioflavonoid". *International journal of*

- pharmaceutical sciences and research* 3(1):3.
- Gumustas M., Kurbanoglu S., Uslu B., ve Ozkan S. A. (2013). *UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters*. 76:21-22.
- Hans M., ve Lowman A. (2002). “Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting”. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 6(4):319–27.
- Hickey J. W., Santos J. L., Williford J. M., ve Mao H. Q. (2015). “Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery”. *Journal of Controlled Release* 219:536–47.
- Honary S., ve Zahir F. (2013). “Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1)”. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(2):255–64.
- İlhamEröz P., Zeybekoğlu E., Özzambak M. E., Öztürk N., Kıyan H. T. (2021). “Farklı nergis kültür çeşitleri soğanlarının in vitro antioksidan, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz aktiviteleri”. *Journal* 10(2):90–101.
- Jain P. S., Chaudhari A. J., Patel S. A., Patel Z. N., ve Patel D. T.. (2011). “Development and validation of the UV-spectrophotometric method for determination of terbinafine hydrochloride in bulk and in formulation”. *Pharmaceutical Methods* 2(3):198–202.
- Jung J. S., Yan J. J., Li H. M., Sultan M. T., Yu J., Lee H. S., Shin K. J., ve Song D. K. (2016). “Protective effects of a dimeric derivative of ferulic acid in animal models of Alzheimer’s disease”. *European Journal of Pharmacology* 782:30–34.
- Kaşık M., Arslan R., Bektas N., Eken H. (2019). “Ferulik Asitin Periferik Analjezik Etkisi ve Olası Mekanizmaları”. *Journal* 9(3):385–92.
- Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., ve Taniguchi H. (2002). “Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(7):2161–68.
- Kim Y. J., Park E. J., Kim T. W., ve Na D. H. (2021). “Recent progress in drug release testing methods of biopolymeric particulate system”. *Pharmaceutics* 13(8):1–23.
- Kroll A., Pillukat M. H., Hahn D., ve Schnekenburger J. (2009). “Current in vitro methods

- in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(2):370–77.
- Kumar N., ve Pruthi V. (2014). “Potential applications of ferulic acid from natural sources”. *Biotechnology Reports* 4(1):86–93.
- Kumari A., Yadav S. K., ve Yadav S. C. (2010). “Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75(1):1–18.
- Kumari B., ve Khansili A. (2020). “Analytical method development and validation of UV-visible spectrophotometric method for the estimation of vildagliptin in gastric medium”. *Drug Research* 70(9):417–23.
- Lee Y. R., Woo K. S., Kim K. J., Son J. R., ve Jeong H. S. (2007). “Antioxidant Activities of Ethanol Extracts from Germinated Specialty Rough Rice TT -”. *Food Science and Biotechnology* 16(5):765–70.
- Li D., Rui Y. X., Guo S. D., Luan F., Liu R., ve Zeng N. (2021). “Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives”. *Life Sciences* 284(September):119921.
- Li S., ve McCarthy S. (1999). “Influence of crystallinity and stereochemistry on the enzymatic degradation of poly(lactide)s”. *Macromolecules* 32(13):4454–56.
- Li W., Chen Q., Baby T., Jin S., Liu Y., Yang G., ve Zhao C. X.. (2021). “Insight into drug encapsulation in polymeric nanoparticles using microfluidic nanoprecipitation”. *Chemical Engineering Science* 235:116468.
- Li Y., Liu C., Zhang Y., Mi S., ve Wang N.. (2011). “Pharmacokinetics of ferulic acid and potential interactions with Honghua and clopidogrel in rats”. *Journal of Ethnopharmacology* 137(1):562–67.
- Lima I. A. d., Khalil N. M., Tominaga T. T., Lechanteur A., Sarmiento B., ve Mainardes R. M. (2018). “Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid”. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46(sup2):993–1002.
- Liu Y., Yang G., Baby T., Tengjisi D. C., Weitz D. A., ve Zhao C. X. (2020a). “Stable Polymer Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading by Sequential Nanoprecipitation”. *Angewandte Chemie* 132(12):4750–58.

- Liu Y., Yang G., Zou D., Hui Y., Nigam K., Middelberg P. J. A., ve Zhao C. X. (2020b). "Formulation of Nanoparticles Using Mixing-Induced Nanoprecipitation for Drug Delivery". *Industrial and Engineering Chemistry Research* 59(9):4134–49.
- Makadia H. K., ve Siegel S. J. (2011). "Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier." *Polymers* 3(3):1377–97.
- Markesbery W. R., (1997). "Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease." *Free Radical Biology & Medicine* 23(1):134–47.
- Martín-Banderas L., Alvarez-Fuentes J., Durán-Lobato M., Prados J., Melguizo C., Fernández-Arévalo M., ve Holgado M. A. (2012). "Cannabinoid Derivate-Loaded PLGA Nanocarriers for Oral Administration: Formulation, Characterization, and Cytotoxicity Studies." *International Journal of Nanomedicine* 7:5793–5806.
- Mendez A. S. L., Steppe M., ve Schapoval E. E. S. (2003). "Validation of HPLC and UV Spectrophotometric Methods for the Determination of Meropenem in Pharmaceutical Dosage Form." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33(5):947–54.
- Merlin J. J. P., Prasad N. R., Shibli S. M. A., ve Sebeela M. (2012). "Ferulic acid loaded Poly- d,l-lactide-co-glycolide nanoparticles: Systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line in vitro". *Biomedicine and Preventive Nutrition* 2(1):69–76.
- Migues V. H., David J. M., Gomes A. F., ve David J. P. (2022). "Determination of Soybean Isoflavone by HPLC/DAD and Simple UV Spectroscopic Analysis: a Comparative Study". *Food Analytical Methods* 15(2):367–76.
- Mishra B., Patel B. B., ve Tiwari S. (2010). "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6(1):9–24.
- Molyneux P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 50(June 2003):211–19.
- Mota F. L., Queimada A. J., Pinho S. P., ve Macedo E. A. (2008). "Aqueous solubility of some natural phenolic compounds". *Industrial and Engineering Chemistry Research*

47(15):5182–89.

- Mourdikoudis S., Pallares R. M., ve Thanh N. T. K. (2018). “Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties”. *Nanoscale* 10(27):12871–934.
- Müderrisoğlu E., Çomoğlu T. (2010). “AN OVERVIEW OF POLYMERIC PARTICULATE DRUG DELIVERY SYSTEM FORMULATIONS”. *Journal* 39(4):343–68.
- Müller R. H., Mäder K., ve Gohla S. (2000). “Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery - a Review of the State of the Art.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 50(1):161–77.
- Muthu M. S., (2009). “Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview”. *Asian Journal of Pharmaceutics* 3(4):266–73.
- Nagavarma B. V. N., Yadav H. K. S., A. Ayaz, Vasudha L. S., ve Shivakumar H. G. (2012). “Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review”. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(SUPPL. 3):16–23.
- Nair K. L., Jagadeeshan S., Nair S. A., ve Kumar G. S. V. (2011). “Biological Evaluation of 5-Fluorouracil Nanoparticles for Cancer Chemotherapy and Its Dependence on the Carrier, PLGA.” *International Journal of Nanomedicine* 6:1685–97.
- Narayanan V., Mani M. K., ve Thambusamy S. (2020). “Electrospinning preparation and spectral characterizations of the inclusion complex of ferulic acid and γ -cyclodextrin with encapsulation into polyvinyl alcohol electrospun nanofibers”. *Journal of Molecular Structure* 1221:128767.
- O’Donnell P. B., ve McGinity J. W. (1997). “Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28(1):25–42.
- Orhan I., ve Üstün O. (2011). “Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey”. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(3):386–90.
- Ozkan S. A., (2018). “Analytical method validation: The importance for pharmaceutical analysis”. *Pharmaceutical Sciences* 24(1):1–2.

- Öztürk A. A., (2017). Deksketoprofen Trometamol Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in Vitro/In Vivo Değerlendirilmesi Yayınlanmış Doktora Tezi. Eskişehir: *Anadolu University, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Öztürk A. A., Güven U. M., ve Yenilmez E. (2018a). “Flurbiprofen loaded gel based topical delivery system: Formulation and in vitro characterization with new developed UPLC method”. *Acta Pharmaceutica Scientia* 56(4):81–105.
- Öztürk A. A., Banderas L. M., Otero M. D. C, Yenilmez E., ve Yazan Y. (2018b). “New approach to hypertension treatment: Carvediol-loaded PLGA nanoparticles, preparation, in vitro characterization and gastrointestinal stability”. *Latin American Journal of Pharmacy* 37(9):1730–41.
- Öztürk A. A, Gündüz B. A., ve Ozisik O. (2018c). “Supervised Machine Learning Algorithms for Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles and Particle Size”. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 21(9):693–99.
- Öztürk A A., Yenilmez E. ve Özarda M. G. (2019a). “Clarithromycin-Loaded Poly (Lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles for Oral Administration: Effect of Polymer Molecular Weight and Surface Modification with Chitosan on Formulation, Nanoparticle Characterization and Antibacterial Effects”. *Polymers* 11(10).
- Öztürk A. A., Aygül A., ve Şenel B. (2019b). “Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity”. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 54:101240.
- Öztürk A. A., Banderas L. M., Otero M. D. C., Yenilmez E., Şenel B., ve Yazan Y. (2019c). “Dexketoprofen trometamol-loaded poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles: Preparation, in vitro characterization and cytotoxicity”. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 18(1):1–11.
- Öztürk A. A., ve Güven U. M. (2019d). “Cefaclor monohydrate loaded microemulsion formulation for topical application: Characterization with new developed UPLC method and stability study”. *Marmara Pharmaceutical Journal* 23(3):426–40.
- Öztürk A. A., ve Yurtdaş Kirişlioğlu G. (2019e). “Preparation and in vitro characterization of lamivudine loaded nanoparticles prepared by acid and/or ester

- terminated PLGA for effective oral anti-retroviral therapy”. *Journal of Research in Pharmacy* 23(5):897–913.
- Öztürk A. A., ve Kıyan H. T. (2020a). “Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay”. *Microvascular Research* 128:103961.
- Öztürk A. A., Yenilmez E., Şenel B., Kıyan H. T., ve Güven U. M. (2020b). “Effect of different molecular weight PLGA on flurbiprofen nanoparticles: formulation, characterization, cytotoxicity, and in vivo anti-inflammatory effect by using HET-CAM assay”. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 46(4):682–95.
- Öztürk A. A., Namlı İ., ve Aygül A. (2021). “Cefaclor Monohydrate-Loaded Colon-Targeted Nanoparticles for Use in COVID-19 Dependent Coinfections and Intestinal Symptoms: Formulation, Characterization, Release Kinetics, and Antimicrobial Activity.” *Assay and Drug Development Technologies* 19(3):156–75.
- Öztürk A. A., Ünver H., ve Kıyan H. T. (2023a). “Antioxidant and Antiangiogenic Effect of Homoleptic Palladium (II) Carboxamide Complex Loaded Chitosan Modified PLGA Nanoparticles: In vitro Evaluation and In vivo Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay”. *Letters in Drug Design & Discovery* 20(8):1158–70.
- Öztürk A. A., Başaran E., Şenel B., Demirel M., ve Sarıca Ş. (2023b). “Synthesis, characterization, antioxidant activity of Quercetin, Rutin and Quercetin-Rutin incorporated β -cyclodextrin inclusion complexes and determination of their activity in NIH-3T3, MDA-MB-231 and A549 cell lines”. *Journal of Molecular Structure* 1282:135169.
- Pal S. L., Jana U., Manna P. K., Mohanta G. P., ve Manavalan R. (2011). “Nanoparticle: An overview of preparation and characterization”. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(6):228–34.
- Panwar R., Pemmaraju S. C., Sharma A. K., ve Pruthi V. (2016). “Efficacy of Ferulic Acid Encapsulated Chitosan Nanoparticles against Candida Albicans Biofilm.” *Microbial Pathogenesis* 95:21–31.
- Panyam J., Williams D., Dash A., Leslie-Pelecky D., ve Labhasetwar V. (2004). “Solid-State Solubility Influences Encapsulation and Release of Hydrophobic Drugs from

- PLGA/PLA Nanoparticles.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93(7):1804–14.
- Phadke A. V., Tayade A. A., ve Khambete M. P. (2021). “Therapeutic potential of ferulic acid and its derivatives in Alzheimer’s disease—A systematic review”. *Chemical Biology and Drug Design* 98(5):713–21.
- Pinheiro R. G. R., Granja A., Loureiro J. A., Pereira M C., Pinheiro M., Neves A. R., ve Reis S. (2020). “Quercetin Lipid Nanoparticles Functionalized with Transferrin for Alzheimer’s Disease.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 148:105314.
- Pinto Reis C., Neufeld R. J., Ribeiro A. J., ve Veiga F. (2006). “Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles”. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2(1):8–21.
- PubChem. (2004). “Ferulik asit”. *PubChem [İnternet]. Bethesda (MD): Ulusal Tıp Kütüphanesi (ABD), Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi; 2004-. CID 445858 için PubChem Bileşik Özeti, Ferulik asit; [alıntı tarihi: 7 Mayıs 2023]*.
- Raman S., Khan A. A., ve Mahmood S. (2022). “Nose to brain delivery of selegiline loaded PLGA/lipid nanoparticles: Synthesis, characterisation and brain pharmacokinetics evaluation”. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 77:103923.
- Rao J. P., ve Geckeler K. E. (2011). “Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters”. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 36(7):887–913.
- Rao Y. S., ve Kumari K. P. V. (2020). “Biodegradable nanospheres-current status”. *Indian Drugs* 57(5):7–18.
- Rapalli V. K., Kaul V., Gorantla S., Waghule T., Dubey S. K., Pandey M. M., ve Singhvi G. (2020). “UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: Method development, in-vitro and ex-vivo applications in topical delivery”. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 224:117392.
- Ravisankar P., Navya C. N., Pravallika D., ve Sri D. N. (2015). “A review on step-by-step analytical method validation”. *IOSR Journal Of Pharmacy* 5(10):2250–3013.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., ve Rice-Evans C. (1999).

- “Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay.” *Free Radical Biology & Medicine* 26(9–10):1231–37.
- Revdekar A., ve Shende P. (2021). “Block copolymers in Alzheimer’s disease therapy: A perceptive to revolutionize biomaterials”. *Journal of Controlled Release* 340:271–81.
- Rezaei A., Varshosaz J., Fesharaki M., Farhang A., ve Jafari S. M. (2019). “Improving the Solubility and in Vitro Cytotoxicity (Anticancer Activity) of Ferulic Acid by Loading It into Cyclodextrin Nanosponges.” *International Journal of Nanomedicine* 14:4589–99.
- Romeo A., Musumeci T., Carbone C., Bonaccorso A., Corvo S., Lupo G., Anfuso . D., Puglisi G., ve Pignatello R. (2021). “Ferulic acid-loaded polymeric nanoparticles for potential ocular delivery”. *Pharmaceutics* 13(5):1–19.
- Sahil K., Akanksha M., Singh S. P., Bilandi A., ve Kapoor B. (2011). “Microsphere : A Review”. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 1(4):2231-2781.
- Salatin S., Barar J., Barzegar-Jalali M., Adibkia K., Kiafar F., ve Jelvehgari M. (2017). “Development of a Nanoprecipitation Method for the Entrapment of a Very Water Soluble Drug into Eudragit RL Nanoparticles.” *Research in Pharmaceutical Sciences* 12(1):1–14.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A., ve Saura-Calixto F. (1998). “A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76(2):270–76.
- Sayiner Ö., ve Çomoglu T. (2016). “Targeting with nanocarrier systems”. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi* 40(3):62–79.
- Schliecker G., Schmidt C., Fuchs S., ve Kissel T. (2003). “Characterization of a homologous series of d,l-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro”. *Biomaterials* 24(21):3835–44.
- Schubert S., Delaney J. T., ve Schubert U. S. (2011). “Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: From history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid)”. *Soft Matter* 7(5):1581–88.

- Şenel B., ve Öztürk A. A. (2019). “New approaches to tumor therapy with siRNA-decorated and chitosan-modified PLGA nanoparticles”. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 45(11):1835–48.
- Sengel Turk T., Hascicek C. (2009). “Polimerik nanopartikuler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu”. *Journal* 38(2):137–54.
- Senthil Kumar C., Thangam R., Mary S. A., Kannan P. R., Arun G., ve Madhan B. (2020). “Targeted Delivery and Apoptosis Induction of Trans-Resveratrol-Ferulic Acid Loaded Chitosan Coated Folic Acid Conjugate Solid Lipid Nanoparticles in Colon Cancer Cells”. *Carbohydrate Polymers* 231:115682.
- Sgarbossa A., Giacomazza D., ve Carlo M. D.. (2015). “Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer’s Disease Therapy from Plants”. *Nutrients* 7(7):5764–82.
- Shen J., ve Burgess D. J. (2013). “In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: Recent developments and challenges”. *Drug Delivery and Translational Research* 3(5):409–15.
- Silva-Buzanello R. A. d., Ferro A. C., Bona E., Cardozo-Filho L., Hermes de Araújo P. H., Leimann F. V., ve Gonçalves O. H. (2015). “Validation of an Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Technique for the Quantitative Determination of Curcumin in Poly(L-Lactic Acid) Nanoparticles.” *Food Chemistry* 172:99–104.
- Srinivasan M., Sudheer A. R., ve Menon V. P. (2007). “Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property”. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40(2):92–100.
- Sudheer A. R., Chandran K., Marimuthu S., ve Menon V. P. (2005). “Ferulic acid modulates altered lipid profiles and prooxidant/antioxidant status in circulation during nicotine-induced toxicity: A dose-dependent study”. *Toxicology Mechanisms and Methods* 15(6):375–81.
- Sudheer A. R., Muthukumaran S., Kalpana C., Srinivasan M., ve Menon V. P. (2007). “Protective Effect of Ferulic Acid on Nicotine-Induced DNA Damage and Cellular Changes in Cultured Rat Peripheral Blood Lymphocytes: A Comparison with N-Acetylcysteine.” *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 21(4):576–85.

- Truzzi F., Valerii M. C., Tibaldi C., Zhang Y., Abduazizova V., Spisni E., ve Dinelli G. (2020). “Are Supplements Safe? Effects of Gallic and Ferulic Acids on In Vitro Cell Models”. *Nutrients* 12(6).
- Turkez H., Arslan M. E., Barboza J. N., Kahraman C. Y., de Sousa D. P., Mardinoğlu A. (2022). “Therapeutic Potential of Ferulic Acid in Alzheimer’s Disease”. *Current Drug Delivery* 8(19):860–73.
- Tüylek Z. (2019). “İlaç taşıyıcı nanosistemler”. *Archives Medical Review Journal* 28(2):184–92.
- Urbaniak A., Szelag M., ve Molski M. (2013). “Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid”. *Computational and Theoretical Chemistry* 1012:33–40.
- Varela-Fernández R., Bendicho-Lavilla C., Martin-Pastor M., Vanrell R. H., Lema-Gesto M. I, González-Barcia M., ve Otero-Espinar F. J. (2022). “Design, optimization, and in vitro characterization of idebenone-loaded PLGA microspheres for LHON treatment”. *International Journal of Pharmaceutics* 616:121504.
- Vega E., Gamisans F., García M. L., Chauvet A., Lacoulonche F., ve Egea M. A. (2008). “PLGA Nanospheres for the Ocular Delivery of Flurbiprofen: Drug Release and Interactions.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(12):5306–17.
- Wang B., Ouyang J., Liu Y., Yang J., Wei L., Li K., ve Yang H. (2004). “Sodium Ferulate Inhibits Atherosclerosis in Hyperlipidemia Rabbits”. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 43(4).
- Wang Z. L. (2001). “Characterization of Nanophase Materials”. *Particle & Particle Systems Characterization* 18:142–65.
- Warren G. W. ve Singh A. K. (2013). “Nicotine and Lung Cancer.” *Journal of Carcinogenesis* 11:1.
- Wischke C., ve Schwendeman S. P. (2008). “Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles”. *International Journal of Pharmaceutics* 364(2):298–327.
- Worldwide M. I. (2011). “Dynamic light scattering, common terms defined,” Inform white paper.” *Malvern Instruments Limited* 2011:1–6.

- Yan N., Tang Z., Xu Y., Li X., ve Wang Q. (2020). "Pharmacokinetic Study of Ferulic Acid Following Transdermal or Intragastric Administration in Rats". *AAPS PharmSciTech* 21(5):1–7.
- Yang H., Li J., Patel S. K., Palmer K. E., Devlin B., ve Rohan L. C. (2019). "Design of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles for Vaginal Co-Delivery of Griffithsin and Dapivirine and Their Synergistic Effect for HIV Prophylaxis." *Pharmaceutics* 11(4).
- Yasir M., Singh Sara U. V., Chauhan I., Bisht D., Puri D., ve Maurya J. (2019). "Donepezil Base: Physicochemical Characterization, HPLC Method Development, Validation and its Application for the Determination of Shelf Life in Developed Solid Lipid Nanoparticles". *Current Nanomedicine* 10(1):48–62.
- Yenilmez E., Öztürk A. A., ve Başaran E. (2023). "Preparation and In vitro, Ex vivo Evaluation of Benzidamine Hydrochloride Loaded Fast Dissolving Oral Strip Formulations: Treatment of Oral Mucositis Due to Side Effects of Chemotherapy and Radiotherapy". *Letters in Drug Design & Discovery* 20(8):1147–57.
- Yurtdaş Kırımlioğlu G., ve Öztürk A. A. (2020). "Levocetirizine Dihydrochloride-Loaded Chitosan Nanoparticles: Formulation and In Vitro Evaluation." *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 17(1):27–35.
- Zduńska K., Dana A., Kolodziejczak A., ve Rotsztejn H. (2018). "Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application". *Skin Pharmacology and Physiology* 31(6):332–36.
- Zhang Y., Huo M., Zhou J, Zou A., Li W., Yao C., ve Xie S. (2010). "DDSolver: An Add-in Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles." *The AAPS Journal* 12(3):263–71.
- Zhou Z. Y., Xu J. Q., Zhao W. R., Chen X. L., Jin Y., Tang N., ve Tang J. Y. (2017). "Ferulic acid relaxed rat aortic, small mesenteric and coronary arteries by blocking voltage-gated calcium channel and calcium desensitization via dephosphorylation of ERK1/2 and MYPT1". *European Journal of Pharmacology* 815:26–32.
- Zielinska A., Carreiró F., Oliveira A. M., Neves A., Pires B., Venkatesh D. N., Durazzo, Lucarini A. M., Eder P., Silva A. M., Santini A., ve Souto E. B. (2020). "Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology".

Molecules 25(16).

Zuo J., Gao Y., Bou-Chacra N., ve Löbenberg R. (2014). “Evaluation of the DDSolver software applications”. *BioMed Research International* 2014.

http-1: <https://healthcare.evonik.com/en/drugdelivery/parenteral-drug-delivery/parenteral-excipients/bioresorbable-polymers/standard-polymers>
(Erişim tarihi: 08.06.2023)