

**KAFEİN İÇEREN KOZMETİK AMAÇLI
KİTOSAN JEL FORMÜLASYONU
GELİŞTİRİLMESİ VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Buket KARAPINAR

Eskişehir 2021

**KAFEİN İÇEREN KOZMETİK AMAÇLI
KİTOSAN JEL FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Buket KARAPINAR

Yüksek Lisans Tezi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ

ESKİŞEHİR

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2021

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Buket KARAPINAR'ın 'Kafein İçeren Kozmetik Amaçlı Kitosan Jel Formülasyonu Geliştirilmesi vee *İn-Vitro* Değerlendirilmesi' başlıklı tezi 04/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Kozmetoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve GÜVEN	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

KAFEİN İÇEREN KOZMETİK AMAÇLI KITOSAN JEL FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Buket KARAPINAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2021

Danışman: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ

Bu tez çalışmasının amacı, kitosan jel formülasyonunun hazırlanması, yaşlanma karşıtı olarak kullanılan etkin madde kafeinin formülasyona eklenmesi, kontrollü salım gösteren yeni bir kozmetik preparat geliştirilmesi ve sistemin *in vitro* karakterizasyon ve salım çalışmalarının yapılmasıdır.

Kafein fotoyaşlanma belirtilerinin gecikmesinde altın standart olan güneşten koruyucu etki gösteren ve cilt üzerine uygulandığında kan damarlarını genişleterek daha zinde ve küçük kırışıklıkları azaltan aynı zamanda antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuvar ve anti kanser özelliklere sahip bir bileşendir.

Kozmetik ürünlerde kafeinin tercih edilmesinin başlıca avantajları, ciltte aşırı yağ birikimini önlemesi, lenfatik drenajı teşvik etmesi ve cildi ışık hasarından korumasıdır.

Bu çalışmada, kafein içeren kozmetik amaçlı kitosan jel formülasyonu geliştirilmiştir. Formülasyonun karakterizasyonu ve 3 aylık kararlılık çalışması yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde kitosan jelin kafein için başarılı bir taşıyıcı sistem olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Kafein, Kitosan, Deri, Kozmetik.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CAFFEIN COSMETIC KITOSAN GEL FORMULATION AND *IN VITRO* EVALUATION

Buket KARAPINAR

Department of Pharmaceutical Technology

Programme in Cosmetology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2021

Supervisor:

Assoc.Prof.Dr. Evrim YENİLMEZ

The aim of this thesis study is to prepare the chitosan gel formulation, to add the active ingredient caffeine used as an antiaging agent to the formulation, to develop a new cosmetic preparation with controlled release and to carry out *in vitro* characterization and release studies of the system.

Caffeine is a sunscreen, which is the gold standard in delaying the signs of photoaging, and when applied on the skin, it dilates the blood vessels and reduces small wrinkles and also has antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties.

The main advantages of caffeine in cosmetic products are that it prevents excessive oil accumulation on the skin, promotes lymphatic drainage and protects the skin from light damage.

In this study, a cosmetic chitosan gel formulation containing caffeine was developed. Characterization of the formulation and a 3-month stability study was carried out. When the results are evaluated, chitosan gel is thought to be a successful carrier system for caffeine.

Keywords: Caffeine, Chitosan, Skin, Cosmetics.

TEŞEKKÜR

Bu tezin ortaya çıkmasında teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara kadar tüm bu süreçlerde bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, bana büyük bir anlayış ve sabırla yaklaşan, beni bu süreçte cesaretlendirmesini esirgemeyen ve desteğini her adımda hissettiğim çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ' e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Araş.Gör. Sinan ÖZER'e ve Araş.gör. Kadir AYKAÇ'a teşekkür ederim.

Pratik çalışmalarım esnasında benden laboratuvar arkadaşlığını ve desteğini esirgemeyen Aya Yahya Fayez El-Oran'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeği büyük olan, benden hayatımın her adımında ilgi ve desteğini esirgemeyen ve maddi manevi her koşulda yanımda olan sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen, bu zorlu sürecimde büyük bir ilgi ve anlayışla benim yanımda olan Tansu KOŞARSOY'a teşekkür ederim.

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.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Kitosan	2
2.1.1. Kitosanın tarihçesi	2
2.1.2. Kitosanın üretimi ve yapısı	3
2.1.3. Kitosanın karakterizasyon özellikleri	5
2.1.3.1. <i>Deasetilasyon derecesi</i>	6
2.1.3.2. <i>Molekül ağırlığı</i>	6
2.1.3.3. <i>Viskozite</i>	6
2.1.3.4. <i>Renk</i>	7
2.1.3.5. <i>Çözünürlük</i>	7
2.1.3.6. <i>Kitosanın toksisitesi</i>	7
2.1.3.7. <i>Antimikrobiyal özellikler</i>	8
2.1.4. Kitosanın kullanım alanları	8
2.2. Hidrojeller	10
2.2.1. Hidrojellerin hazırlanması ve yapısal karakterizasyonu	10
2.2.1.1. <i>Hidrojellerin şişme testleri</i>	12
2.2.1.1.1. <i>Kinetik şişme ölçümleri</i>	12
2.2.1.1.2. <i>Kinetik büzülme ölçümleri</i>	12
2.2.1.1.3. <i>Jellerin sıcaklık duyarlılıklarının ölçülmesi</i>	12

2.3. Deri Yaşlanması Ve Deri Sağlığının Korunması	13
2.3.1. Deri sağlığının korunması	16
2.4. Kafein	16
2.4.1. Kafeinin eldesi	16
2.4.2. Farmakolojik özellikleri	17
3. GEREÇLER	21
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
3.2 Kullanılan Cihazlar	22
4. YÖNTEMLER	23
4.1 Kafein ile yapılan çalışmalar	23
4.1.1. Erime derecesi tayini	23
4.1.2. Termal analiz	23
4.1.3. X-ışını kırınım analizi	23
4.1.4. İnfrared (FT-IR) analizi	23
4.2. Kitosan ile Yapılan Çalışmalar	23
4.2.1. Termal analiz	23
4.2.2. X-ışını kırınım analizi	24
4.2.3. İnfrared (FT-IR) analizi	24
4.3. Kafeinin Miktar Tayini İçin UV Spektrofotometrik Yöntem Çalışmaları ..	24
4.3.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları	24
4.3.1.1. Doğrusallık	24
4.3.1.2. Doğruluk	25
4.3.1.3. Kesinlik	25
4.3.1.4. Seçicilik	25
4.3.1.5. Duyarlılık	26
4.4. Kitosan Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	26
4.4.1. Etkin maddeli kitosan jel formülasyonunun hazırlanması	27
4.5 Kitosan Jel Formülasyonunun Karakterizasyon Çalışmaları	28
4.5.1. Formülasyonların pH değeri ölçümü	28
4.5.2. Formülasyonlarda termal analiz	28
4.5.3. Formülasyonlarda reolojik analiz	28
4.5.4. X-ışını kırınım analizi	28
4.5.5. İnfrared (FT-IR) analizi	28

4.5.6. Etkin madde miktar tayini çalışması	29
4.5.7. <i>In vitro</i> salım çalışması	29
4.6. Kararlılık Çalışmaları	29
5. BULGULAR	30
5.1. Kafein ile Yapılan Çalışmalar	30
5.1.1. Erime derecesi tayini	30
5.1.2. Termal analiz	30
5.1.3. X-ışını kırınım analizi	30
5.1.4. İnfrared (FT-IR) analizi	31
5.2. Kitosan ile Yapılan Çalışmalar	31
5.2.1. Termal analiz	31
5.2.2. X-ışını kırınım analizi	32
5.2.3. İnfrared (FT-IR) analizi	32
5.3. Kafeinin Miktar Tayini İçin UV Spektrofotometrik Yöntem Çalışmaları ..	33
5.3.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları	33
5.3.1.1. <i>Doğrusallık</i>	33
5.3.1.2. <i>Doğruluk</i>	34
5.3.1.3. <i>Kesinlik</i>	35
5.3.1.4. <i>Seçicilik</i>	36
5.3.1.5. <i>Duyarlılık</i>	36
5.4. Kitosan Jel Formülasyonunun Karakterizasyon Çalışmaları	37
5.4.1. Formülasyonların pH değeri ölçümü	37
5.4.2. Formülasyonlarda termal analiz	37
5.4.3. Formülasyonlarda reolojik analiz	37
5.4.4. X-ışını kırınım analizi	38
5.4.5. İnfrared (FT-IR) analizi	38
5.4.6. Etkin madde miktar tayini çalışması	39
5.4.7. <i>In vitro</i> salım çalışması	39
5.5. Kararlılık Çalışmaları	40
6. TARTIŞMA	42
6.1. Formülasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları	42
6.2. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon	44
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	46

KAYNAKÇA	47
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Kitosanın mevcut kullanım alanları	8
Çizelge 2.2. Kafein içeren kozmetik ürünlere örnekler	20
Çizelge 4.1. Formülasyon çalışmaları	26
Çizelge 4.2. Optimum formülasyon	27
Çizelge 4.3. Etkin maddeli formülasyon	27
Çizelge 5.1. Doğrusallık çalışması için hazırlanan konsantrasyonlar ve absorbands Değerleri	33
Çizelge 5.2. Doğruluk çalışması için hazırlanan konsantrasyonlar ve absorbands değerleri (n=6)	35
Çizelge 5.3. Kesinlik çalışması için hazırlanan konsantrasyonlar ve absorbands değerleri (n=3)	36
Çizelge 5.4 Formülasyonlara ait pH değerleri (n=3)	37
Çizelge 5.5. Kararlılık testleri	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kitin ve kitosan kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2. İnsan derisi katmanları	14
Şekil 2.3. Kafeinin kimyasal şekli	16
Şekil 5.1. Etkin maddeye ait DSC termogramı	30
Şekil 5.2. Kafeine ait X-ışını kırınım profili	30
Şekil 5.3. Kafeine ait FT-IR spektrumu	31
Şekil 5.4. LMWK ait DSC termogramı	31
Şekil 5.5. LMWK ait X-ışını kırınım profili	32
Şekil 5.6. LMWK ait FT-IR spektrumu	32
Şekil 5.7. Kafeine ait distile su ortamındaki UV spektrum	33
Şekil 5.8. Kafeinin distile su ortamındaki standart eğrisi	34
Şekil 5.9. DSC termogramları	37
Şekil 5.10. B ₁ Formülasyonuna ait 0. Zaman reogramı	38
Şekil 5.11. XRD paternleri	38
Şekil 5.12. FTIR spektrumları	39
Şekil 5.13. Salım profilleri	40
Şekil 5.14. B ₁ formülasyonuna ait 3. Ay reogramları	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Asetik Asit
ABS	: Absorbans
ANOVA	: Analysis of variance
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
GKF	: Güneşten Koruma Faktörü
KTS-DNA	: Kitosan Deoksiribo Nükleik Asit
LMWK	: Düşük molekül ağırlıklı kitosan
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Tayin limiti
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
r^2	: Determinasyon katsayısı
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RSD	: Standart sapma
p	: Olasılık
SH	: Standart hata
SS	: Standart sapma
TPP	: Tripolifosfatlar
UPLC	: Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

UV	: Ultraviyole
UVA	: Ultraviyole A
UVB	: Ultraviyole B
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
XRD	: X ışını kırınımı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ve yenilenebilen doğal bir kaynak olan kitinden elde edile kitosanın, yapılan birçok çalışmada bakterilerin büyümesini engellediği görülmüş ve böylece antimikrobiyal aktivite için aktif madde olarak kullanılmaktadır.

Yenilenebilir bir kaynak ve çevre dostu doğal bir biyopolimer olan kitosanın tüm bu karakterizasyon özellikleri göz önünde bulundurularak antibakteriyel ve antifungal aktivitesindeki üstünlüğü iyi bir güvenlik profili çizmekte ve böylece eczacılık, biyomedikal, kimya, kozmetik, tekstil ve gıda endüstrileri alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hidrojellerin göstermiş olduğu en belirgin spesifik davranışları su tutma kapasiteleri, geçirgenlikleri ve biyoyumluluklarıdır. Bu yüksek doku benzeri su içeriğine sahip hidrojeller besin maddelerinin girmesi veya metabolitlerin atılması gibi geçirgenlik özelliklerine sahiptirler. Hidrojellerin yüksek su içerikleri doğal dokulara çok benzer bir esneklik derecesine sahip olmalarını sağlamaktadır. Biyolojik dokulara olan biyoyumlulukları kozmetik alanda sık kullanılmalarını sağlamaktadır.

Cilt yaşlanması; iç veya dış faktörlerin veya bunların birlikteliğinin neden olduğu kaçınılmaz bir şekilde ortaya çıkan kompleks biyolojik bir süreçtir. Farmasötik taşıyıcı sistemlerin, kozmetik formüllerinde kullanılmasıyla gelişen üretim teknolojileri, son yıllardaki sürdürülebilir yaklaşımları da hesaba katarak, temel kozmetik bakıma alternatifler sunmaktadır.

Gelişen kozmetik üretim teknolojisini kullanarak üretilen aktif bileşenler, sürdürülebilir ve doğal kaynaklı hammaddelerin de kozmetik bileşenleri olarak kullanımının artması ve farmasötik taşıyıcı sistemlerin kozmetik formüllerinde kullanılması toplumların artan kozmetik beklentilerini karşılamayı hedeflemektedir. Bu tez çalışmasında, cilt yaşlanması karşıtı kafein içeren kitosan jel formülasyonu hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kitosan

Kitosan, mantarların hücre duvarlarının ana bileşeni olan, ayrıca kalamar ve ahtapot da dahil olmak üzere, eklembacaklılar, kabuklular, yengeç, ıstakoz, karides, böcekler, yumuşakçalar ve kafadan bacaklıların iskeletinden kimyasal yolla elde edilen, bir N-asetil-D-glukozamin polimeridir. Doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ve yenilenebilen doğal bir kaynak olan kitinin selülozdan farkı zincirindeki C2 karbon yapısındaki hidroksil grubu yerine asetamino grubunun bulunmasıdır. Yılda en az 10 gigaton kitin biyosferde kullanılıp hidrolize olurken, doğada ana zincir yapısında azot bulunan polimerler içinde de en bol bulunan doğal polimerdir [1, 2].

Kitosan ise bu N-asetil-D-glukozamin polimeri yapısındaki kitinin deasetile edilmesiyle elde edilen molekül ağırlığı 50-2000 kDa arasında değişmekte olan bir D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin kopolimeridir. Bu deasetilasyon işlemi kitindeki asetilamino (-NH-CO-CH₃) gruplarının bazik ortamda amino (-NH₂) gruplarına dönüştürülmesi işlemi olup bu işlem sonunda N-asetil-D-glukozamin grupları tamamen dönüştürülemez ancak sayıları D-glukozamin gruplarına göre azalmaktadır [3].

Aminoasetil grubunun dönüştürülmesi ile geride amino grubu kalır ve polimer zinciri pozitif yüklü hale gelmektedir. Yapılan bu deasetilasyon işleminin derecesi amino gruplarının asetilamino gruplarına oranına göre değerlendirilir. Kitinin kitosana dönüşüm aşamasında kitin kitosana %80-90 deasetilasyon derecesi oranında yaklaşmaktadır [3, 4].

2.1.1. Kitosanın tarihçesi

Kitin ilk kez 1811 yılında Fransa'da Prof.Dr. Henri Braconnot'un mantarlar üzerine yaptığı bir çalışmada mantar hücre duvarından fungin adını verdiği kısmı izole etmesi sırasında bu yapının amonyak içerdiğini gözlemlemesi ve bitkilerde o zamana kadar en farklı yapı olduğunu söylemesiyle ortaya çıkmıştır [3].

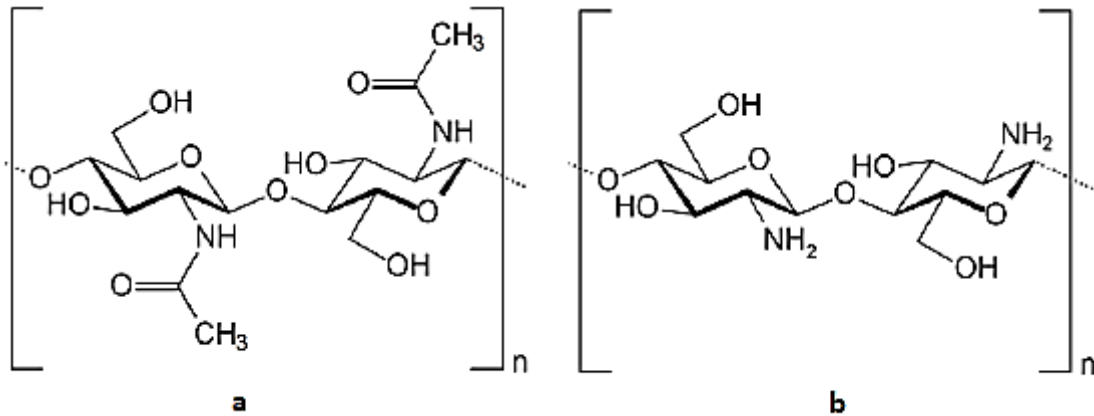
1832 yılında Odier böcek kabukları üzerine yaptığı çalışmada böcek kabuklarında ve tırnak örtülerinde Prof.Dr. Henri Braconnot'un bahsettiği bu farklı yapının bulunduğunu keşfetmiştir. Bu çalışmalar sayesinde bitkiler ve böcekler arasındaki bir bağ olduğu da ortaya çıkmıştır [2, 3].

1811 yılında mantarlarda keşfedilmiş olan, daha sonra 1830'lu yıllarda böceklerden izole edilen ve 1859 yılına gelindiğinde ise kitini derişik potasyum hidroksit çözeltisinde ısıtması ile Rouget tarafından kitosan bulunmuştur [2, 3, 5].

2.1.2. Kitosanın üretimi ve yapısı

Kitosanın elde edildiği kitin, yapısal olarak selülozun türevlendirilmiş hali olmaktadır. Selülozun zincir yapısındaki C2'deki hidroksil grubu yerine de kitinde asetamid grubu bulunmaktadır. Kitinin doğada alfa, beta ve gama formları bulunmaktadır. Alfa formu doğada en çok bulunan formu olup antiparalel zincir yapısı bulunmaktadır. Deniz kabuklularında, küf, maya ve böceklerde bulunmaktadır. Beta formu doğada en az bulunan antiparalel zincir yapısı olup mürekkep balığının kollarında bulunurken gama formu da hem antiparalel hem paralel zincir formuna sahip olup böceklerin kozalarında görülmektedir [2, 5, 6].

Kitosan ise kitinin alkali ortamda deasetile edilerek aseamid grubunun uzaklaştırılarak geride amino grubunun kalmasıyla elde edilen molekül ağırlığı 100 ile 1200 kDa arasında değişen katyonik bir polisakkarittir [5]. Genel olarak bu kitosanın üretimi kimyasal ve biyolojik olmak üzere iki temel yöntem dayanmaktadır. Kimyasal yöntem kimyasal ve fiziksel yöntemlerin bir arada kullanıldığı yöntem olmakla birlikte asidik ve bazik hidroliz aktif rol oynamaktadır [7]. Biyolojik yöntemde enzimatik ve mikrobiyal yöntemlere dayanmakla beraber tüm bu kitosan üretimi yöntemlerinin esasını demineralizasyon, deproteinizasyon ve deasetilasyon aşamaları oluşturmaktadır [5, 7].



Şekil 2.1. Kitin (a) ve kitosan (b) kimyasal yapısı [8]

Kimyasal yöntemle kitosan üretimi aşamasında kitinden proteinlerin uzaklaştırılması için düşük derişimde sodyum hidroksit (NaOH) veya potasyum hidroksit (KOH) gibi bazik çözeltiler kullanılırken diğer minerallerin uzaklaştırılmasında ise hidroklorik asit (HCl) gibi sulu asit çözeltilerinden yararlanılmaktadır. Böylece kitinle kompleks haldeki astaksantinlerin kloroform (CHCl₃), hidrojen peroksit (H₂O₂), aseton (C₃H₆O), potasyum permanganat (KMnO₄), sodyum hipoklorit (NaClO) veya etil asetat (C₄H₈O₂) ile dekolorizasyon aşamasıyla uzaklaştırılmasıyla elde edilen kitinin deasetilasyon aşamasıyla kitosana dönüştüğü görülmektedir. Bu deasetilasyon işlemi yüksek sıcaklıklarda (100-150°C) ve derişik (%40-50) NaOH çözeltisi kullanarak gerçekleştirilmektedir [5].

Biyolojik yöntemlerden olan enzimatik üretimin deprotenizasyon aşamasında pepsin, tripsin, proteaz, proteinaz ve papain gibi proteolitik aktiviteye sahip olan enzimler; deasetilasyon aşamasında ise kitin deasetilaz enzimi aktif rol oynamaktadır [5].

Biyolojik yöntemlerden bir diğeri olan mikrobiyal üretimde ise deminerilizasyon için *Rhizopus oryzae*, *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus plantarum* gibi laktik asit üreten mikroorganizmalar; deproteinizasyon için *Teredinobacter turnirae* ve *Lactobacillus plantarum* gibi proteaz aktivitesine sahip olan mikroorganizmalar; deasetilasyon için ise *Mucor rouxii*, *Aspergillus niger* ve *Rhizopus oryzae* gibi kitin deasetilaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar rol oynamaktadır [5].

Üretilen kitosanın genelde 0.1-10 mm boyut aralığında olması endüstriyel kullanımını engellediği için nano ve mikro boyutlara küçültülmesi gerekmektedir. Emülsiyon çapraz-bağlama tekniği, çöktürme tekniği, püskürterek kurutma tekniği, emülsiyon damlacık birleştirme tekniği, iyonik jelleşme tekniği, ters misel tekniği gibi yöntemlerle küçük parçacık boyutunda kitosan üretimi sağlanmakta ve böylece kitosanın adsorpsiyon kapasitesi, ilaç salım kapasitesi gibi özelliklerinin arttığı gözlemlenmektedir.

Bu yöntemlerden emülsiyon çapraz-bağlama tekniği, amino gruplarının, glutaraldehitin aldehit gruplarıyla etkileşmesiyle kitosanın parçacık boyutunun kontrol altına alınmasına dayanmaktadır.

Çöktürme tekniği, özellikle KTS-DNA nanoparçacıklarının üretimi aşamasında çapraz bağlayıcılar kullanılarak parçacıkların katılaştırılması ile ilaç salımını kontrol altına almayı hedeflemektedir.

Püskürterek kurutma tekniği püskürtülen parçacıkların sıcak hava akımından geçirilerek kurutulmasına dayanmakta olup bu teknikte sprey akış hızı, atomizasyon basıncı, çapraz bağlanma derecesi gibi parametreler parçacık boyutunun kontrol altına alınmasını sağlamaktadır.

Emülsiyon damlacık birleştirme tekniği ile emülsiyon ve çöktürme aşamaları bir arada kullanılarak kitosanın deasetilasyon derecesine bağlı olarak parçacık boyutları kontrol altına alınmaktadır. Deasetilasyon derecesi azaldıkça parçacık boyutu artmakta ancak ilaç tutma kapasitesinde azalma meydana gelmektedir.

İyonik jelleşme tekniği ile istenmeyen kötü özelliklerden kaçınmak amacıyla ajan olarak elektrostatik etkileşimler ile fiziksel şekilde bağlanan tripolifosfatlar (TPP) kullanılarak kitosan nanoparçacıkları elde edilmektedir.

Ters misel tekniği ile yüzey aktif maddenin organik bir çözücüde çözünmesi ile hazırlanan ters misel ortamında son aşamada saflaştırma yapılarak yüzey aktif maddeler uzaklaştırılmakta ve nanoparçacıklar elde edilmektedir [5, 9].

2.1.3. Kitosanın karakterizasyon özellikleri

Kitinin kitosana deasetile olmasıyla aseamid grubu uzaklaştırılarak geride amino grubu kalmaktadır. Kitosanın yapısındaki bu amino grubu asetilasyon, kuarternerleşme, aldehit ve ketonlarla Schiff bazı verme, alkillenme, graft olma, metallere şelat oluşumu gibi kimyasal reaksiyonların verilmesini sağlamaktadır [10].

Kitinin kitosana dönüşüm aşamasında kitin kitosana %80-90 deasetilasyon derecesi oranında yaklaşmaktadır. Bu deasetilasyonun süresi kitosanın üretileceği kitinin kaynağına ve deasetilasyon metoduna göre değişiklik göstermektedir [4, 5].

Oluşan bu kitosanın fizikokimyasal özellikleri de moleköl ağırlığına ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak değişiklik gösterirken bu deasetilasyon derecesi ve moleköl ağırlığı özellikleri ise kitinin kaynağına, izolasyon yöntemine, sodyum hidroksit ile işlem görme süresine, derişimine ve işlem sırasındaki sıcaklığına bağlıdır [7].

2.1.3.1. Deasetilasyon derecesi

Kitinin molekül zincirindeki asetil grubunun uzaklaştırılması olarak tanımlanmaktadır. Kitosanda kalan amino grubu kitosanın kimyasal modifikasyonunu sağlamaktadır. Kitosanın birçok fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değerlendirilmesinde bu deasetilasyonun derecesi dikkate alınmaktadır. Deasetilasyon derecesi genellikle %75 ve daha yukarı olan değerlerdeki kitin, kitosan olarak kabul edilebilmektedir. Ancak kitosanın deasetilasyon derecesi elde edildiği kaynağın türüne ve hazırlanma metoduna göre %56 ile %99 arasında değişebilmektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için ninhidrin testi, lineer potansiyometrik titrasyon, FT-IR, NMR, HBr titrasyonu, UV-spektrofotometre gibi birçok metot kullanılmaktadır [2, 9].

2.1.3.2. Molekül ağırlığı

Kitosanın molekül ağırlığı 100 ile 1200 kDa arasında değişmektedir. Molekül ağırlığı kitosanın antimikrobiyal aktivitesini etkileyen en önemli proseslerden biri olmakla birlikte, kullanılan hammaddenin cinsine ve hazırlanma metoduna göre değişmektedir. Molekül ağırlığının belirlenmesinde jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK), ışık saçılma spektroskopisi ve viskozimetrik yöntemler gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ortamda bulunan çözünmüş oksijen veya çok yüksek sıcaklıklar kitosanın parçalanmasına sebep olarak molekül ağırlığını azaltmaktadır. Böylece değişen molekül ağırlığı kitosanın fizikokimyasal özelliklerini de etkilemekte ve buna bağlı kitosan ile hazırlanan farmasötik formülasyonların özellikleri de değişmektedir. Örneğin azalan molekül ağırlığı kitosanın sudaki çözünürlüğünü artırmakta veya yüksek molekül ağırlığı ve dallanmamış düz yapısı kitosanı asidik ortamlarda mükemmel bir viskozite artırıcı madde yapmaktadır [2, 7, 11].

2.1.3.3. Viskozite

Kitosanın ticari uygulanabilirliğini etkileyen en önemli parametrelerden olan viskozite deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, iyonik kuvvet, pH ve sıcaklık gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Kitosan konsantrasyonu arttıkça, ortam sıcaklığı azaldıkça veya kitosanın asetilasyon derecesi arttıkça kitosan çözeltisinin viskozitesi artar. Ayrıca yüksek molekül ağırlığı ve dallanmamış düz yapısı kitosanı asidik ortamlarda mükemmel bir viskozite artırıcı madde yapmakta ve lizozim enzimiyle

parçalanma, yaraları iyileştirme gibi kitosanın biyolojik özelliklerini de etkileyebilmektedir [2, 6, 11, 12].

2.1.3.4. Renk

Kitosanın rengi kabuklu deniz canlılarının yapısında bulunan temel karoten astaksantin adı verilen karotenimsi pigmentten kaynaklanmaktadır. Kitinle kompleks haldeki astaksantinlerin kloroform (CHCl_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), potasyum permanganat (KMnO_4), sodyum hipoklorit (NaClO) veya etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) ile dekolorizasyon aşamasıyla uzaklaştırılmasıyla elde edilen kitinin deasetilasyon aşamasıyla kitosana dönüştüğü görülmektedir. Toz halindeki kitosan oldukça yumuşak olup rengi açık sarıdan beyaza kadar çeşitli tonlarda değişebilmektedir [2, 5, 11].

2.1.3.5. Çözünürlük

Kitosan, birçok organik çözücüde çözünmezken, katyonik yapısı sayesinde $\text{pH} < 6$ ortamında bazı seyreltik asit çözeltilerinde kolaylıkla çözünebilmektedir. İnorganik asitlerde çözünürlüğü oldukça düşük iken asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitlerde genellikle daha iyi çözünmektedir. En çok kullanılan çözücü ise yaklaşık $\text{pH} 4$ deki %1 lik asetik asit çözeltilisidir. $\text{pH} 7$ nin üzerinde kitosanın çözünürlük kararlılığı zayıftır. Yüksek pH değerlerinde, çökme veya jel oluşturma eğilimi bulunmaktadır [2, 9, 11].

2.1.3.6. Kitosanın toksisitesi

Kitosanın toksisitesi üzerine çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ribeiro vd. tarafından sıçan derisinden elde edilen fibroblastlarda kitosan hidrojenlerin *in vitro* çalışmaları, Aspden vd. tarafından kurbağa, insan burun damak dokusu ve sıçanların burun zarlarında yapılan çalışmalar, Carreno-gomez vd. tarafından tavşanlarda intravenöz kitosan uygulamaları gibi çalışmalarla kitosanın toksisitesinin ihmal edilebilir düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Genel olarak kitosanın insanlardaki toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte Gades ve ark tarafından insan gönüllülerinde yapılan kitosanın günlük olarak 4,5 g'ın üzerinde alımına yönelik çalışmalarda toksik etkilere yol açmadığı gözlemlenmiştir. Hatta 6,75g'a kadar oral alımların bile güvenilir olduğu bildirilmiştir [13].

2.1.3.7. Antimikrobiyal özellikler

Yapılan birçok çalışmada kitosanın bakterilerin büyümesini engellediği görülmüş ve böylece antimikrobiyal aktivite için aktif madde olarak kullanılmıştır. Bu antimikrobiyal aktivite kullanılan kitosanın molekül ağırlığına, konsantrasyonuna ve ayrıca bakteri çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Antimikrobiyal aktivitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte Zheng ve Zhu'ya göre kitosanın konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal aktivitesi kuvvetlenmektedir [14, 15].

2.1.4. Kitosanın kullanım alanları

Yenilenebilir bir kaynak ve çevre dostu doğal bir biyopolimer olan kitosanın tüm bu karakterizasyon özellikleri göz önünde bulundurularak antibakteriyel ve antifungal aktivitesindeki üstünlüğü iyi bir güvenlik profili çizmekte ve böylece eczacılık, biyomedikal, kimya, kozmetik, tekstil ve gıda endüstrileri alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [1].

Kitosan biyobozunur, biyouyumlu, düşük toksikitesi ve film oluşturma özellikleri ile gıda endüstrisinde meyveleri patojenlere karşı koruyarak potansiyel bir kaplama ajanı olarak görev almakta, farmasötik alanda ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında; kozmetik alanda, saç, deri ve diş bakım ürünlerinde; tıp/dişçilik alanında yapay deri, cerrahi iplik, kontak lens, antikoagülan, diş dolgu maddesi olarak; biyoteknoloji alanında, enzim, canlı hücre immobilizasyonu, hücre enkapsülasyonu gibi alanlarında oldukça tercih edilmektedir [2, 6]. Kitosanın ana uygulama alanları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kitosanın mevcut kullanım alanları [2, 7, 11, 16]

KİTOSANIN KULLANIM ALANLARI

TARIM	Bitkilerde savunma mekanizması ve bitki büyümesini hızlandırma Bitki katkı maddesi ve antimikrobiyal olarak tohum kaplama Gübre yapımı Insektisid ve nematositlerde
SU ARITIMI	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon (içme suyu ve havuzlarda) Atık sulardaki metal iyonların uzaklaştırılması ve geri kazanımı

Çizelge 2.1. (Devam) *Kitosanın mevcut kullanım alanları [2, 7, 11, 16]*

	Ekolojik polimer (sentetik polimerlerin giderimi)
	Kokunun azaltılması
GIDA	Lipid bağlayıcı (kolesterol düşürücü) Meyveler için antibakteriyel, antifungal, koruyucu kaplama Doğal kıvamlaştırıcı Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi Yiyecek işlemede (örneğin şeker işleme) Filtreleme ve temizleme Hipokolestrolemik madde (zayıflama maddesi) Atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi Gıdaların raf ömrünün uzatılmasında
MEDİKAL ALAN	Hayvan ve insanlar için yara bandı yapımında Sargı bezi yapımında ve yara tedavisinde (yara tedavisini % 30 oranında hızlandırmaktadır.) Yanık tedavisinde acıyı dindirme ve iyileştirme etkisi Kanı pıhtılaştırıcı madde Hidrojel yapımı Antikoagülant ve antitrombojenik materyaller (sülfatlanmış -kitin türevleri olarak) Hemostatik madde Kontakt lens yapımı Yapay deri ve yapay kan damarı İlaç salımı
BİYOTEKNOLOJİ	Kromatografik yöntemlerde Enzim immobilizasyonunda
KOZMETİK	Akne tedavisi Saç esnekliği Saçtaki statik elektriğin azaltılması Ağız sağlığı (diş macunu, sakız) Deri tonu Cilt nemlendirmede (nemlendirici kremlerde) Antikolestrol ve yağ bağlayıcı olarak zayıflama maddesi Aftershave, deodorantlarda koku giderici madde

Tüm bu biyouyumluluk, biyobozunurluk, antibakteriyel özellik, düşük maliyet, düşük toksisite ve daha birçok kullanım alanları gibi avantajları nedeniyle kitosan, hidrojenlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir polisakarittir.

2.2. Hidrojeller

Çok sayıda monomer biriminin bir araya gelmesiyle oluşan polimer zincirleridir. Birbirlerine düz bağlanabileceği gibi çapraz olarak da bağlanabilirler. Dallenmanın olması çözünürlüğü düşürse de çapraz bağlı yapılar çözünmeyip çözücü emerek şişerler. Çapraz bağlı polimerlerin su ortamında şişmesiyle oluşan, katı faz ve toplam hacmin çoğunu sıvı fazın oluşturduğu jel sistemleridirler. Hidrojellerde sıvı faz sudur ve katı faz jelin kıvamını sağlamaktadır. Hidrojelin suda çözünmeyip suyu emerek şişmesinin sebebi yapısında bulunan polimer ağlarındaki fiziksel ve kimyasal bağlardan kaynaklanmaktadır [17-20].

Bir polimerin hidrojel sayılabilmesi için ana zincir ya da yan dallarında su sever bir hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilen yapıların bulunması gerekmektedir. Bu gruplardan dolayı bağı duruma geçen su sayesinde kütlelerinin %20'sinden daha fazla çözücü bünyelerine alarak şişme yeteneği gösterirler [21].

Bir hidrojin jelleşme miktarı ve şişme derecesi sıcaklığa, pH'ya, ağ yapının esnekliğine, polimer zincirleri içerisindeki fonksiyonel hidrofilik grupların varlığına, çapraz bağlanma oranına, itici ve çekici iyonik etkileşimler arasındaki dengeye ve çözücü ortam etkilerine bağlıdır. Hidrojeller tüm bu değişkenlere cevap olarak şişmekte veya büzölmektedirler. Örneğin yapısındaki çapraz bağların artması jelleşmeyi azaltırken, iyonik yapıların fazla olması jelleşmeyi kuvvetlendirmektedir. Hidrojeller bunun gibi çevre koşullarındaki pH, iyonik kuvvet, elektrik alan, magnetik alan, çözücü bileşimi, ışık, basınç ve sıcaklık gibi birçok uyarıcıya cevap verebilen nadide yapılardan biri olmaları sebebi ile kullanım alanları oldukça geniştir [22-24].

2.2.1. Hidrojellerin hazırlanması ve yapısal karakterizasyonu

Genel olarak hidrojenler kimyasal çapraz bağlanma ile serbest radikal polimerleşmesi şeklinde veya yüksek enerjili ışınlar ile radikalik zincir polimerleşmesi şeklinde hazırlanmaktadır.

Kimyasal çapraz bağlanma ile hidrojel oluşumunda bir veya daha fazla çeşit monomerin çapraz radikal başlatıcılar kullanılarak bağlanmasıyla oluşturulmaktadır. Bu oluşumda en çok kullanılan radikalik başlatıcılar, amonyum persülfat, potasyum persülfat ile benzoil peroksit gibi peroksitlerdir. Ayrıca bu oluşumlarda çapraz bağ yoğunluğunun fazla olması hidrojinin şişme derecesini düşürmektedir.

Yüksek enerjili ışınlar ile hidrojel oluşumunda polimer zincirleri elektron bombardımanı, X, UV veya gamma ışınlarıyla uyarılmasıyla aktif hale gelerek α , β ve γ ışınları, elektronlar, protonlar ve nötronlar gibi hızlandırılmış taneciklerin etkisi sonucu oluşturulmaktadır. Bu oluşumun diğerinden üstünlüğü katı, sıvı, gaz fazlarından istenilende yapılabilmesi ve diğer yöntemlerle polimerleştirilmesi zor monomerlerin daha kolay polimerleştirilmesini sağlamaktadır [22-25].

Çapraz bağlı bu sistemlerin yapısını ve spesifik fonksiyonlarını belirlemede rol oynayan 4 farklı etkileşim mevcuttur. Bu etkileşimlerden esas olanları kovalent ve iyonik bağlardır. Bu bağlardan biraz daha zayıf etkileşimler olan Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı ile bir arada tutulan yapılar da, bu sistemlerde çapraz bağ gibi davranarak hidrojel davranışı göstermektedirler. Yani gerçek anlamda çapraz bağlı olmayan hidrofilik polimerler de hidrojel oluşturarak suda çözünmezler. Bahsedilen bu etkileşimler hidrojellerin büyüklük, sıcaklığa verilen tepki ve sulu ortamda gösterdiği spesifik davranışlarını belirlemektedir [22, 23, 26].

Tüm bu etkileşimler ışığında hidrojellerin göstermiş olduğu en belirgin spesifik davranışları su tutma kapasiteleri, geçirgenlikleri ve biyoyumluluklarıdır. Bu spesifik davranışlardan su tutma kapasitesi homo veya kopolimerlerden oluşan hidrojellerin yapısındaki polar ve hidrofilik grupların oluşturduğu hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Su tutan bu grupların etrafında kütleli bir büyüme olur ve jel şişmeye başlar. Bu jel formatında 3 çeşit su formundan bahsedilmektedir. Birinci su polimerin polar ve hidrofilik gruplarıyla hidrojen bağı sayesinde bağlanan bağlı sudur. İkinci su polimerin su sevmeyen grupları etrafında kümeleşen hidrojen bağından daha zayıf bir bağ ile tutunan ara yüzey suyudur ve son olarak üçüncü su ise çapraz bağlı polimer zincirlerinin arasındaki boşlukları dolduran herhangi bir bağ ile fiziksel olarak bağlı olmayan serbest sudur [23].

2.2.1.1. Hidrojelleri şişme testleri

Hidrojellerin polimer ağırları arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimler nedeniyle çözülmeden bu suyu tutabilme kapasitelerinden dolayı karakterizasyon özelliklerinin tayinindeki en temel yaklaşımlardan biri şişme davranışlarının ölçülmesidir. Hidrojellerin yapı iskeletine çeşitli komonomerlerin bağlanması ile uyarıcılara tepki verebilen akıllı jeller oluşturulmuştur. Hidrojeller, böylece çevre koşullarındaki sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve elektrik alanı gibi belirli harici uyaranlara yanıt olarak şişme ve büzüşme gibi hacim değişiklikleri gösterebilir. Bu sebeple hidrojeller genellikle hacim değişikliklerinin getirdiği şişme dereceleri ile tanımlanırlar. Hidrojellerin bu şişme dereceleri dinamik şişme testleri ile ölçülebilmektedir. Dinamik şişme testleri sonucunda elde edilen verilerle en uygun hidrojel modelleri tercih edilebilmektedir [22].

2.2.1.1.1. Kinetik şişme ölçümleri

Dinamik şişme testi için önce kuru hidrojel tartılır. Sonra sulu çözelti içine daldırılıp belli aralıklarla çıkarılarak tekrar tartılırlar. Bu işleme hidrojel sabit bir ağırlığa ulaşmaya dek devam edilir. Sabit bir ağırlığa ulaşan jel maksimum su tutma kapasitesine ulaşmış demektir [22, 27].

2.2.1.1.2. Kinetik büzülme ölçümleri

20°C'deki suda maksimum su tutma kapasitesine ulaşarak belli bir dengeye ulaşan jeller 80°C'deki diğer ortama alınarak su kapasitelerindeki azalma belirli aralıklarla gravimetrik yöntemlerle ölçülmüştür.

2.2.1.1.3. Jellerin sıcaklık duyarlılıklarının ölçülmesi

Belirli bir şişme dengesine ulaşan jellerin farklı sıcaklıklardaki şişme derecelerinin ölçülmesidir. Bir sıcaklık ölçümünden diğer sıcaklıktaki ölçüme geçmeden önce jellerin şişme dengesine gelmesi beklenir ve o sıcaklıktaki şişme derecesi kaydedilir [23].

Hidrojellerin yüksek su içerikleri doğal dokulara çok benzer bir esneklik derecesine sahip olmalarını sağlamaktadır. Bu da biyolojik dokulara olan biyouyumluklarını ön plana çıkararak kozmetik anlamda sık kullanılmalarını sağlamaktadır.

Bu yüksek doku benzeri su içeriğine sahip hidrojeller besin maddelerinin girmesi veya metabolitlerin atılması gibi geçirgenlik özelliklerine sahiptirler [25].

Hidrojeller tüm bu üstün özellikleri ile bulunduğu biyolojik ortama uyum sağlama ve çevreden gelebilecek sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi tepkilere kontrollü bir şekilde cevap verebilmeleri ile son dönemde birçok doku mühendisliği alanlarında, biyomedikal çalışmalarda ilaç sanayinde, teknoloji ve kozmetik alanda kullanılmakta ve yapılacak çalışma için en uygun hidrojel seçmek adına çeşitli özelliklerine göre de sınıflandırılmaktadırlar. Ayrıca hidrojeller, kaynaklarına, hazırlama yöntemlerine, içerdikleri yan gruplara, fiziksel yapılarına, su içeriklerine, kimyasal kararlılıklarına, uyarı cevap türlerine ve çapraz bağlanma durumlarına bağlı olarak sınıflandırılmaktadırlar [17, 23-25].

2.3. Deri Yaşlanması ve Deri Sağlığının Korunması

Geriatrici alanında çok sık kullanılan ‘yaşlanma’ ve ‘yaşlılık’ kavramları arasında net bir ayrımın olmadığı ve çoğunlukla birbirlerinin yerine kullanılarak yanlış ifade edildikleri görülmektedir.

Zaman içerisinde oluşan yıpranma ve bozulma süreci canlı organizmalar için yaşlanma olarak tanımlanır. Yalnız bu süreçte canlı organizmaların yenilenme mekanizması devrededir. Bu nedenle her canlının ölümüne kadar aldığı bu mesafe yaşlanma olarak ifade edilmektedir.

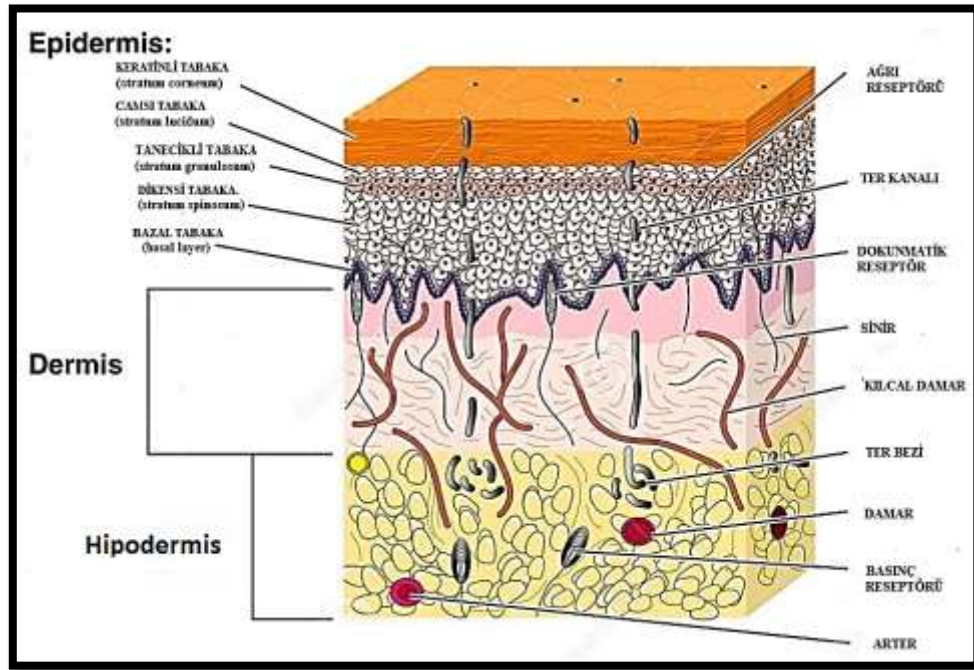
Yaşlılık ise canlının doğurganlığının bittiği dönemden ölüme kadar geçen zaman diliminde doğurganlığının azalması, mortalitenin artması gibi değişim ve dönüşüm sürecidir [28].

Bu sebeple yaşlılık fiziksel ve psikolojik boyutlarıyla değerlendirilmesi gereken bir tanımdır. Fiziksel boyutuyla yaşlılık zamanın ilerlemesi sonucu yaşla birlikte görülen değişimler iken psikolojik boyutuyla algı, öğrenme ve psikomotor faaliyetlerde azalma gibi insanın etrafına uyum kapasitesindeki azalma olarak değerlendirilir [28, 29].

Yaşlanma ise zaman içerisinde kaçınılmaz bir şekilde ortaya çıkan kompleks biyolojik bir olaydır. Biyolojik veya kronolojik yaşlanma olarak da bilinen ve genetik olarak programlanmış doğal bir süreç içerisinde oluşur. Günlük yaşantımızda ve kozmetik anlamda yaşlanma denince çoğunlukla derimiz esas alındığından ve yaşlanma tanımına özellikle yüzdeki yaşlanmanın söz konusu edildiğini varsayarsak sıkıntının çoğunlukla UV kaynaklı olduğunu söyleyebiliriz ki buna fotoyaşlanma denmektedir. Zaman içerisinde yaşlanma sürecimize fotoyaşlanmaya ek olarak diğer dış maruziyetler

de dahil olmaktadır. Geri kalan kısmı ise vücudun tamamının yaşlanmasına paralel gelişen bir olaylar zinciridir ki buna da kronolojik yaşlanma denmektedir.

Bu yaşlanma sürecinde maruz kaldığımız iç ve dış faktörlerin hepsi cildimiz tarafından açığa vurulmaktadır. Çünkü deri bedenimizi dış etkenlere karşı koruyan, vücudun sıvı dengesini ve ısısının sabit kalmasını sağlayan, bu arada da çeşitli maddeler salgılayan, her şeyden önemlisi çevremizle ilişkimizi kuran, algılayan, uyarıcı en büyük organımızdır. Tüm bu görev ve işlevlerinin dışında derimiz kişiye özgünlüğünü ve belki de toplum içinde ilk bakıştaki değerlendirilmesine yönelik katkıda bulunmaktadır. Böylece derimiz görünüşümüz üzerinde hayati bir rol oynamakta ve bu anlamda estetik ve toplumsal önemi olan bir organdır [28-32].



Şekil 2.2. İnsan derisi katmanları [33]

Epidermis cildin en dış tabakası olup (Şekil 2.2.) canlı dokulardan oluşmaktadır ve kozmetik açıdan cildin en önemli tabakasıdır. Kullanılan kozmetik preparatlar genelde epidermisin birinci alt tabakası olan stratum corneum'a uygulanmaktadır. Hücre çoğalması ve melanin pigmenti sentezi ise epidermisin beşinci alt tabakası olan stratum basale'de gerçekleşmektedir. Epidermisin altındaki dermis tabakası ise cilde gerginliğini veren kollajen, cildin gerginliğini koruyan elastin, glikozaminler ve sudan oluşmaktadır. Ayrıca bu tabakada cildin su tutulumunu arttıran başlıca molekül olan hyaluronik asit

sayesinde de cildin suyunu ve nemini koruması ile cildin kurumasını engellenmektedir [32, 34, 35].

Derimiz, genetiğimiz, hücre metabolizmamız, hormonlar ve vücudumuzdaki metabolik olaylar gibi iç faktörlerden etkilenir iken, ışığa maruziyet, kirlilik, radyasyon, kimyasallar ve toksinler gibi dış faktörler gibi olumsuzluklardan da etkilenmeye açık bir organımızdır. Yetersiz beslenme, yoğun stres, sigara ve alkol kullanımı gibi kötü yaşam tarzı seçeneği de deri yaşlanmasını etkileyen diğer faktörlerdendir [30, 31].

Bu maruziyetler sonucunda deride yaşlanma yaklaşımları olarak en çok göze çarpan değişiklikler kuruluk, ince ve derin kırışıklıklar, elastikiyette azalma, lekelenme, cildin gerginliğini kaybetmesi, epidermin incilmesi, kırışıklık, sarkma ve derinin parlaklığını yitirmesidir [28, 31, 32].

Deri yaşlanması, genetik programa bağlı olarak sonuçları bireysel farklılıklar gösteren kronolojik yaşlanma ve UV ışınlarına sık ve tekrarlayan maruziyet sonucu ortaya çıkan kümülatif etkilerin kronolojik yaşlanma belirtileri üzerine eklenmesiyle oluşan fotoyaşlanma olarak ikiye ayrılır. Kronolojik yaşlamada genetiğe bağlı olarak metabolik faaliyetler ve endokrin faktörler rol oynamaktadır. Primer etkiler genel olarak hücre yenilenmesinin yavaşlaması, yara iyileşmesinde ve derinin immünolojik yanıtlarında gecikme, D vitamini üretim kapasitesinde azalma veya yavaşlamalar görülmektedir. Yaşın ilerlemesi ile beraber epidermis ve dermis kalınlığında azalma, melanosit ve fibroblastların sayılarında azalma ve işlev bozukluğu, ter ve yağ bezlerinin fonksiyonlarında da azalma görülmektedir. Tüm bunlara ek kronolojik yaşlanmada epidermal yenilenme zamanı %30-50 uzamakta, buna bağlı olarak epidermise besin transfer mekanizmaları bozulmakta ve yaşlanma süreci hızlanmaktadır. Fotoyaşlanma da ise ultraviyoleye maruziyet sebebi ile serbest oksijen radikalleri oluşumunu tetikleyerek kollajen yıkımına ve elastin birikimine neden olan gen ekspresyonları indüklenerek deride kalınlaşma, kabalaşma, sararma, esneklik kaybı, derin kırışıklıklar, düzensiz pigmentasyon gibi olumsuzluklar görülmektedir. Ultraviyole-A (UVA) dermal değişikliklere, ultraviyole-B (UVB) ise epidermal değişikliklere yol açarak fotoyaşlanma da etkili olmaktadır [31, 36].

2.3.1. Deri sağlığının korunması

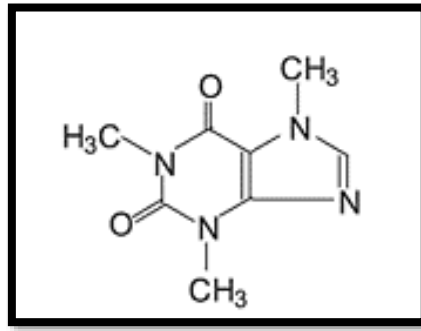
Güneş koruyucuları fotoyaşlanma belirtilerinin gecikmesinde altın standarttır. Bir güneşten koruyucu ürünün etkinliği bu ürünün Güneşten Koruma Faktörü (GKF) değerine dayanmaktadır. Bu değer arttıkça koruyuculuk etkisi artmaktadır. Güneşten koruyuculardan en iyi etkiyi almak için güneşe çıkmadan yarım saat önce tüm maruz kalınacak bölgelere sürmek ve maruziyet boyunca iki saatte bir bunu tekrarlamaktır. Bunun dışında bir diğer korunma yolları da ışığı yansıtan açık renkli kıyafetler tercih etmek, güneş gözlüğü ve şapka kullanmaktır.

Antioksidanlar, toksik oksijen molekülleri ve serbest radikalleri nötralize ederek vücut dokularındaki oksidatif stresi önleyip, hücre membranlarını koruyucudurlar [31, 37, 38].

2.4. Kafein

2.4.1. Kafeinin eldesi

Kafein (Şekil 2.3.) çay yaprakları, kahve çekirdekleri, kakao tohumlarında, kola fındıklarında ve az miktarda mate ve guaranada bulunan 1,3,7 pozisyonunda metil grubu taşıyan pürin (CSN₄H₄) türevi doğal bir alkaloiddir. Kafeine 1,3,7 Trimetilksantin de denir. Kapalı formülü C₈-H₁₀-N₄-O₂, molekül ağırlığı 194.19 olan kafein çeşitli Coffea türlerine ait bitkinin genç veya olgun yapraklarındaki çekirdeklerde bulunan ana bileşeni pürin bazı taşıyan heterosiklik yapıda bir alkaloidtir ve kahveye karakteristik acılığını verir. Kahve (% 1-2), çay (%2-4), guarana, kola (% 1-3) ve mate'de bulunan beyaz bir toz olan kafein ilk defa 1820 de Runge tarafından saf olarak izole edilmiştir. Çay, kahve ve kakao çekirdeklerinden sanayii düzeyinde üretilmekte olup 1861 de Strecker tarafından teobrominin metilasyonu ile sentetik olarak hazırlanmıştır [39-41].



Şekil 2.3. Kafeinin kimyasal şekli [42]

Kafeinin karakterizasyonu erime noktasının belirlenmesi, kızılötesi spektroskopisi, diferansiyel tarama kalorimetresi ile bozulma, yüksek performanslı sıvı kromatografi ile saflık kontrolü gibi fiziksel yöntemlere dayanmakla birlikte kafeinin araştırma faaliyetlerinin çoğu kromatografik yöntemlere odaklanmıştır. Ancak hızlılığı, doğruluğu, tekrarlanabilirliği ve ucuz olması nedeniyle spektrofotometrik yöntemler tercih edilmektedir [43, 44].

Kafeinin sanayi düzeyinde eldesi çaydan, kahveden ve sentetik yoldan olmak üzere 3 şekilde gerçekleşmektedir. Çaydan eldesi *thea sinensis* yapraklarından veya işlenmiş çayın ekstraksiyon yolu ile üretimi gerçekleşmektedir. Siyah çay %4, yeşil çay ise %3 oranında kafein içermektedir. *Coffea arabica* yani kahve bitkisinde yeşilken %1-2 oranında kafein içermektedir. Bu bitkiden de solvent ekstraksiyonla veya su ekstraksiyonu ile uzaklaştırılması ve kafeinin süblimleştirilmesi için kahvenin ısıtılması işlemleri ile üretimi gerçekleşmektedir. Sentetik yolda ise kafeinin çoğu bu yöntemle elde edilmektedir. *Theobroma cacao* yani kakao bitkisinin metilasyonu ile kafeine dönüştürülmesiyle kafein sentetik yolla elde edilmektedir [39].

2.4.2. Farmakolojik özellikleri

Kafein karaciğerde sitokrom P450 oksidaz sistemi tarafından metabolize olarak paraksantin (lipoliz oranını artırır), teobromin (bir vazodilatör) ve teofilin (bronşiyal düz kas gevşetici) gibi farklı işlevlere sahip 3 dimetilksantine ayrılır. Kafein, bir metilksantin yapısı olarak siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve adenosine benzer. Kafein yutulduktan sonra gastrointestinal sistem tarafından emilir ve kan dolaşımı yoluyla merkezi sinir sistemine taşınır. Orada fosfodiesteraz enzimini inhibe eder ve merkezi adenosin reseptörleri üzerinde antagonistik bir etkiye sebep olur. Bunun sonucu olarak merkezi sinir sisteminin uyararak kan basıncını artırır ve uykuya dalma süresini uzatır, mide bağırsak salgılarını artırarak iştah azalmasına sebep olur. Kan- beyin bariyerini aşan kafein adenosin A1 ve A2 reseptörlerine bağlanır ve daha sonra asetilkolin, dopamin, noradrenalin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin salınmasına neden olur ve bunların tümü konsantrasyonu ve ruh halini iyileştirerek zihinsel aktivitenin artmasına ve çalışma kapasitesinin artmasını sağlar. Molekül ayrıca solunum hızını ve derinliğini artırır [45-47].

1,3,7-trimetilksantin olarak tanımlanan kafein, insan epidermisine nüfuz eden ancak kan dolaşımına kolayca emilmeyen iyi bir genel ve lokal toleransa sahip

alkaloiddir. Kafein deri altı yağ dokusu üzerinde fosfodiesterazın inhibisyonu yoluyla yağ hücrelerinin lipolizine neden olur. Bu yağ ayrıştırıcı etkiye sahip olması nedeniyle selülit tedavisinde kullanılabilceği belirtilmektedir. Ayrıca kafein cilt üzerine uygulandığında kan damarlarını genişleterek daha zinde ve küçük kırışıklıkları azaltan bir etki gözlenmektedir [46, 47].

Kafein yüksek biyolojik aktivitesi ve epidermise nüfuz etme yeteneği ile topikal ve transdermal anlamda antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, anti kanser ve antiaging bir bileşen olarak kullanılabilmektedir. Kozmetik ürünlerde kafeinin tercih edilmesinin başlıca avantajları, ciltte aşırı yağ birikimini önlemesi, lenfatik drenajı teşvik etmesi ve cildi ışık hasarından korumasıdır.

Kafeinin kozmetik ürünlerdeki bu faydalarını destekleyici birçok çalışma mevcuttur. Cilt yaşlanmasını hızlandıran maruz kaldığımız UV radyasyon, cildimizde hücre ölümüne neden olabilecek yağ ve proteinlere zarar veren reaktif oksijen (ROS) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimini hızlandırır. Ayrıca bu UV radyasyona ek olarak hücre ölümüne sebebiyet veren reaktif oksijen türleri vücudumuzun normal metabolik süreçleri olan P450 döngüsü ve lipid peroksidasyonu ile de üretilir. Silverberg ve arkadaşları tarafından yapılan *in vitro* çalışmalarda derimizdeki elastin ve kollajen sentezini sağlayan yirmi insan derisi fibroblastına 4 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (1, 0.1 ve 0.01 mM) kafein uygulanmıştır. Bu dokular 30 dakika hidrojen peroksit maruz bırakılmıştır, sonuç olarak uygulanan kafeinin fibroblastlarda doku ölümünü engelleyip bir antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. 120 dakika hidrojen peroksit maruz bırakıldığında ise fibroblastlarda gözle görülür değişiklikler olmuş ve bu da hücre ölümünün yaklaştığının habercisi olarak bir uyarıcı görevi görmüştür.

Rosacea, atopik dermatit ve sedef hastalığı gibi iltihaplı dermatozlar, epidermal bariyer bozulduğunda derideki keratinositlerde daha önceden biriken proinflamatuvar sitokinlerin derinin üst katmanlarına doğru açığa çıkması ile deride serbest radikal oluşumunu ve oluşan inflamasyonu şiddetlendirir. Bu da ciltte kızarıklığa sebep olur. Deride bulunan kan damarlarının sayısındaki artış bu serbest radikallerin cilt yüzeyine daha fazla ulaşmasına sebep olarak ciltteki kızarıklığı artırır. Ferzli ve arkadaşlarının *in vivo* çalışması sonucu kafein içeren antioksidanların topikal bir kombinasyonu, 16 deneye 12 hafta boyunca günde iki kez uygulanmıştır. 6. haftada kaydedilen sonuçlara göre bu

uygulama vasküler endotelial büyüme faktörünü baskılayarak cilt kızarıklığını azalttığı gözlenmiştir [45].

Deri altında bulunan yağ hücrelerinin anormal birikmesiyle deride çöküntü ve portakal kabuğu görünümünü ve sonucunda bazı alanlarda kan dolaşımının bozulması ile oluşan lokalize bir estetik cilt problemine selülit denir. Herman ve arkadaşları kafeinin deri altı yağ dokusu üzerinde fosfodiesterazın inhibisyonu yoluyla yağ hücrelerinin lipolizine neden olması üzerine çalışma yaparak olumlu sonuçlar almışlardır [47-49].

UV güneş radyasyonuna aşırı maruz kalma (özellikle UVB) cildimizde reaktif oksijen türlerinin artmasına sebep olmaktadır. Bu reaktif oksijen türleri cildimizde elastikiyeti sağlayan elastin ve kollajen gibi cilt bileşenleri üzerinde olumsuz etkileri oluşturarak ödem, hiperpigmentasyon, erken cilt yaşlanması ve ilerleyen süreçte kansere sebep olur. UV hasar sonucu ROS ile indüklenen oksidatif hasarı önlemeye yönelik kafeinin kullanılması ile ilgili Conney ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fareler 20 hafta boyunca haftada iki kez UVB'ye maruz bırakılarak insanların erken yaşta maruz kaldıkları UV maruziyeti elde edilmeye çalışılmıştır. Kafeinin oral ve topikal uygulanması ile UV maruziyetiyle indüklenen tümörlerin hücre ölümleri indüklenerek cilt kanseri gelişiminin önemli ölçüde engellendiği gözlemlenmiştir. Lu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada topikal kafein uygulamasının çevredeki normal cildi etkilemeden UV hasarlı hücrelerin seçici olarak apoptozunu indüklediğini gösterilmiştir [45, 48, 50].

Kafeinin yukarıda yapılan çalışmalar ışığında kullanımlarında umut vadeden sonuçlar elde edilmesi, kozmetik formülasyonlarda (Tablo 2.2.) popüler aktif bir madde olarak bulunmasını sağlamıştır. Kafein kozmetik formülasyonlarda, fotoyaşlanma belirtilerinin gecikmesinde altın standart olan güneşten koruyucu etki gösteren ve cilt üzerine uygulandığında kan damarlarını genişleterek daha zinde ve küçük kırışıklıkları azaltan bir krem, jel şeklinde formüle edilmektedir. Ayrıca lipit ayrıştırıcı veya başka bir deyişle yağ yakıcı özelliğinden dolayı selülit tedavisi eden krem/jel formülasyonlarında da yer almaktadır. Kahve çekirdeğinin zar kısmında hazırlanan formülasyonlardaki fenolik bileşikler yaşlılığı hızlandıran oksidatif ajanlara karşı ciltte bariyer görevi görmüş ve böylece yaşlanma karşıtı formülasyonlarda kafeinin kullanılabilmesi fikrini desteklemiştir [47].

Topikal formülasyonların mutlak biyoyararlanımını ölçmek zor olmakla beraber kafeinin kozmetik formülasyonlarında yaşlanma belirtilerinin gecikmesi üzerine yapılan *in vitro* deneyler ışığında genel olarak %0,5-3 oranında kullanıldığı gözlemlenmiştir [51-55]. Tez çalışmamız kafeinin %1' lik formülasyonlarının yaşlanma karşıtı etkisiyle kitosan jel formülasyonu haline getirilmiştir.

Çizelge 2.2. *Kafein içeren kozmetik ürünlere örnekler [56-65]*

Ürün	Firma
Powerful Wrinkle Reducing Eye Cream	
Göz Çevresindeki Kırışıklıkları Hedefleyen Güçlü Göz Kremi	
Facial Fuel Energizing Face Wash	
Yüz Yıkama Jeli	
Body Fuel All-In-One Energizing Wash	Kiehls
Saç Ve Vücut Temizleyicisi	
Facial Fuel Energizing Scrub	
Pürüzsüzleştirici Arındırıcı	
Facial Fuel Eye Fuel	
Göz Bakım Kremi	
Saç Ve Saç Derisi Bakım Kremi	Urban Care
Şampuan	Bioblas
Vegetal Caffeine Lotion	
Vegetal Caffeine Serum	Cosmed
Tıraş Köpüğü	Sante
Organik Kafein Ve Kalpariane Fluid	Logona
Minéral 89 Eyes Göz Çevresi Bakımı	Vichy
Üçlü Oksijen Anlık Enerji Göz Jeli	
Peeling Cilt Tedavisi	Bliss

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde adı

Asetik asit

Asetonitril

Dötorokloroform

Düşük molekül ağırlıklı kitosan

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi tablet

Kafein

Metanol

Mutlak Alkol

Orta molekül ağırlıklı kitosan

Ph 6.8 Fosfat Tamponu

pH 7.4 Fosfat Tamponu

Potasyum fosfat monobazik

Sodyum hidroksit

Sodyum klorür

Yüksek molekül ağırlıklı kitosan

Firma adı

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Novartis/Türkiye

Merck/Almanya

Merck/Almanya

Sigma- Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

Merck/Almanya

Sigma-Aldrich/Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz adı

Buzdolabı
Diferansiyel taramalı kalorimetri
Distile su cihazı
Etüv
Franz Difüzyon Cihazı
Hassas terazi
İnfrared spektrofotometresi
Manyetik karıştırıcı
Mikropipet seti
pH metre
Reometre
Selüloz asetat mebran
Ultrasonik banyo
Uv spektrofotometre
Vorteks karıştırıcı

Firma adı

Arçelik/Türkiye
Shimadzu DSC-60/Japonya
MilliQ Millipore/Fransa
Nüve, FN 500/Türkiye
Hanson/Almanya
Mettler AM 100/ABD
Shimadzu IR-Prestige-21/Japonya
Jeitech MS-53M/Güney Kore
Eppendorf /Almanya
WTW Profi Lab. pH 597/Almanya
Brookfield DV-II
Advantec/Japonya
Elma T470/H/Almanya
Shimadzu UV- 160A /Japonya
Jeitech VM96B/Güney Kore

4.YÖNTEMLER

4.1 Kafein ile Yapılan Çalışmalar

Kafeinin, kitosan jel formülasyonu hazırlanması öncesinde saflığını ve kalitesini ölçmek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.1.1. Erime derecesi tayini

Kafeinin erime noktası erime noktası tayin cihazında ölçülmüştür. Tüm analizler 3 kere yapılmıştır.

4.1.2. Termal analiz

Kafeinin termal analizi DSC (Shimadzu DSC-60, Japonya) cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL·dk⁻¹ azot gazı akış hızı ve 30-270°C aralığında 10°C·dk⁻¹ ısı artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. X-ışını kırınım analizi

Kafeinin XRD analizinde 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2θ açı ve 2°C·dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) kullanılmıştır.

4.1.4. İnfrared (FT-IR) analizi

Kafeinin IR analizi FT-IR (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.2. Kitosan ile yapılan çalışmalar

Farklı molekül ağırlıklarına sahip kitosan polimerleri ile önformülasyon çalışmaları yapılmış ve düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın en uygun jelleşmeyi sağladığı tespit edilmiştir. Bu neden yöntemler kısmında sadece düşük ağırlıklı kitosana (LMWK) ait fizikokimyasal analizlere yer verilmiştir.

4.2.1. Termal analiz

LMWK'ın termal analizi DSC (Shimadzu DSC-60, Japonya) cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL·dk⁻¹ azot gazı akış hızı ve 30-300°C aralığında 10°C·dk⁻¹ ısı artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. X-ışını kırınım analizi

LMWK'ın XRD analizinde 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2 θ açısı ve 2°C·dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) kullanılmıştır.

4.2.3. İnfrared (FT-IR) analizi

LMWK'ın IR analizi FT-IR (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.3. Kafeinin Miktar Tayini İçin UV Spektrofotometrik Yöntem Çalışmaları

In vitro çalışmalarda kafeinin miktar tayini için UV spektrofotometre kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kafeinin distile sudaki maksimum absorbansının saptanabilmesi için 50 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltisi hazırlanmıştır. UV spektrofotometrede 250-400 nm aralığında spektrum alınmış ve absorbans verdiği maksimum dalga boyu belirlenmiştir.

4.3.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları

Validasyon, bir analitik yöntemde bir veya daha fazla analitin içinde bulunduğu formülasyondaki konsantrasyonunun tayini için kullanılan belirli bir yöntemin, hedeflenen uygulama için güvenilirliğini, istenilen duyarlılıkta ölçtüğünü ve uygun kesinliğe sahip olduğunu göstermek adına yapılan çalışmalar bütünüdür. Formülasyondaki etkin maddenin uygun validasyonu için tercih edilecek analitik yöntemde doğruluk, doğrusalık, kesinlik ve tekrar edilebilirlik aşamaları bakımından en objektif sonucu veren seçilmelidir. Çünkü güvenilirliği bilinmeyen hiçbir analitik yöntemin bilimsel değeri yoktur [66].

Kafeinin kitosan hidrojel formülasyonundaki konsantrasyonunun tayini için seçilen UV spektrofotometre yöntemiyle analitik yöntem validasyonlarından doğrusalık, doğruluk, kesinlik ve seçicilik kriterlerine uygunluğunu test edilmiştir.

4.3.1.1. Doğrusallık

Kafeinin farklı konsantrasyonlardaki örnekleri alınarak, bu konsantrasyonların deneysel karşılıkları arasında doğrusal sonuçların alınması esasına dayanır. Kafeine ait standart eğrinin belirlenmesi için 10 mg kafein 100 ml distile suda stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Stok çözeltinin konsantrasyonu böylece 0.1 mg/mL'dir. Bu stok çözeltiden hareketle 3-18 µg/mL konsantrasyonlarında 6 farklı çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin absorbanları, çözücünün maksimum dalga boyunda belirlenmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen absorban değerlerinden, ortama ait doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Her konsantrasyon değeri için deney altı kez tekrarlanmıştır.

4.3.1.2. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu bulunan değer, gerçek değere veya kabul edilen referans değere yakınlığı olarak ifade edilmektedir [66].

Belirlenen referans değer alanından 4, 8, 12 µg/mL konsantrasyonlarında 3 ara değer alınıp UV spektrofotometrede ölçüm yapılmış ve her konsantrasyon için deney 6 kez tekrarlanmıştır.

4.3.1.3. Kesinlik

Aynı şartlar, aynı yöntem, aynı analizci, aynı alet ve aynı laboratuvar ile aynı numunenin çoklu ölçümlerinden elde edilen sonuçların birbirlerine olan yakınlığının başka bir deyişle ölçümlerin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi olarak ifade edilmektedir [66].

Aynı stok çözeltisinden 5, 10 ve 15 µg/mL konsantrasyonlarında 3 farklı değer alınıp her bir konsantrasyon için 3 farklı günde aynı şartlar aynı yöntemle ölçümler alınmıştır (n=3). Her konsantrasyon için ölçüm alınan her günde deney 3 kez tekrarlanmıştır. Gerekli formüller yardımıyla, yöntemin tekrarlanabilirlik ve günler arası kesinlik değerleri hesaplanmıştır.

4.3.1.4. Seçicilik

Bir analitik yöntemin, numunede başka bileşenler olmasına rağmen sadece amaçlanan maddeyi tespit edebilmesidir. Yani analitik yöntem bunu yaparken numunedeki diğer bileşenlerden kaynaklanabilecek girişimlerden etkilenmemelidir. *İn vitro* salım çalışmalarında kullanılan miktarda etkin maddesiz formülasyon hazırlanmış ve salım çalışmalarındaki koşullarda çalışılarak, alınan örneklerin absorbanları ölçülmüş ve yöntemin seçiciliği araştırılmıştır.

4.3.1.5. Duyarluluk

Yöntemimizin, derişimdeki ufak değişimleri tespit kapasitesi ve düşük konsantrasyonları tespit yeteneğini bulmak için, saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamada kullandığımız eşitlikler aşağıda verilmiştir [67, 68].

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{SS}/m \quad (4.1)$$

SS, y eksenini kesen noktanın standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimini ifade etmektedir.

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SS}/m \quad (4.2)$$

SS, y eksenini kesen noktanın standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimini ifade etmektedir.

4.4. Kitosan Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Formülasyon çalışmaları için 3 farklı molekül ağırlığına sahip kitosan kullanılmıştır. Formülasyon çalışmaları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Formülasyonun hazırlanabilmesi için 3 farklı molekül ağırlığındaki kitosandan hareketle tartımlar alınmış ve %0.5 lik asetik asit (AA) çözeltisi ile karıştırılmıştır. Balık yardımıyla manyetik karıştırıcıda 300 rpm de karıştırılıp çözünme dereceleri ve jelleşmeleri gözlemlenmiştir. Formülasyonlara penetrasyon arttııcı olarak alkol ve pH ayarlanması için sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilmiştir. Polimer miktarları jelleşmeye bağlı olarak belirlenmiştir. 0.5 g altında jelleşme gözükmezken 1 g üzerinde jelleşmenin reolojik açıdan uygun olmadığı gözlenmiştir. Tüm çalışmalar oda ısında yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Formülasyon çalışmaları

POLİMER	KİTOSAN (g)	Alkol (mL)	AA Çözeltisi (mL)	NaOH Çözeltisi (mL)
Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.5	0.5	20	0.1
Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.5	0.5	20	0.1
Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.5	0.5	20	0.1
Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.75	0.5	20	0.1
Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.75	0.5	20	0.1
Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.75	0.5	20	0.1
Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan	1	0.5	20	0.1
Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan	1	0.5	20	0.1

Çizelge 4.1.(Devam) *Formülasyon çalışmaları*

Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan	1	0.5	20	0.1
Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.5	0.5	20	0.1
Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.5	0.5	20	0.1
Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.5	0.5	20	0.1
Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.75	0.5	20	0.1
Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.75	0.5	20	0.1
Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan	0.75	0.5	20	0.1
Düşük Molekül Ağırlıklı Kitosan	1	0.5	20	0.1
Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan	1	0.5	20	0.1
Yüksek Molekül Ağırlıklı Kitosan	1	0.5	20	0.1

Orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile istenilen jelleşme ve pH oranına ulaşamadığı için çalışmalar düşük molekül ağırlıklı kitosanla devam edilme kararı alındı. Optimum formülasyon seçildi (B₁) (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *Optimum formülasyon (B₁)*

KİTOSAN (g)	ALKOL (mL)	AA çözeltisi (mL)	NaoH Çözeltisi (mL)	Jelleşme
0.5	0.5	20	0.1	√

4.4.1. Etkin maddeli kitosan jel formülasyonunun hazırlanması

Seçilen optimum formülasyondan hareketle etkin maddeli formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 4.3.). Etkin madde formülasyona jel hazırlandıktan sonra ilave edilmiş, 300 rpm’de karıştırmaya devam edilmiştir. Formülasyonlarda hava kabarcığı olmaması için formülasyonlar 30 dakika sonikatörde tutulmuştur. Analizleri yapılmak üzere ağzı kapalı tüplerde 25 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 4.3. *Etkin maddeli formülasyon*

KİTOSAN (g)	AA çözeltisi (mL)	ALKOL (mL)	NaoH Çözeltisi (mL)	Jelleşme	Kafein (mg)
0.5	20	0.5	0.1	√	5

4.5 Kitosan Jel Formülasyonunun Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanmış olan formülasyonda karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tüm analizler 3 seri halinde yapılmıştır.

4.5.1. Formülasyonların pH değeri ölçümü

Etkin maddeli ve etkin maddesiz formülasyonlarda pH ölçümü yapılmıştır. Formülasyonlar sıfırıncı zamanda hazırlandıktan sonra probun ucunun bir tüp içerisindeki formülasyona daldırılması ile ölçüm yapılmıştır. Etkin maddesiz formülasyonda da ölçüm aynı şekilde yapılmıştır.

4.5.2. Formülasyonlarda termal analiz

25°C'deki fiziksel karışım, etkin maddeli ve etkin maddesiz kitosan jel formülasyonlarından tartım alınarak termal analizi DSC cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kaplarında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı ve 30-300°C aralığında, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.5.3. Formülasyonlarda reolojik analiz

Etkin maddeli formülasyonda, kullanılan maddelerin şekil değişikliğini, katı ise deformasyonunun sıvı ise akışkanlığının ölçülmesi işlemidir. Reometre ile oda ısısında ölçümler gerçekleştirilmiştir.

4.5.4. X-ışını kırınım analizi

Etkin maddeli formülasyonda ve plaseboda XRD analizleri 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2 θ açısı ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) kullanılarak yapılmıştır.

4.5.5. İnfrared (FT-IR) analizi

Etkin maddeli formülasyonda ve plaseboda IR analizleri FT-IR (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.5.6. Etkin madde miktar tayini çalışması

Etkin maddeli formülasyon tartıldıktan sonra su ile ekstre edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Son olarak 40 °C distile su ile ekstre edilip, membran filtreden süzölmüştür. Elde edilen çözelti, UV spektrofotometrede ölçölmüş ve denklemde yerine konularak formülasyondaki kafein miktarı hesaplanmıştır.

4.5.7. *In vitro* salım çalışması

In vitro salım çalışmaları Hanson yarı otomatik Franz Difüzyon Cihazı ile sentetik membran kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kafein içeren kitosan hidrojelin sentetik membrandan salımı franz difüzyon hücresi ile gerçekleştirilmiştir. Selöloz astat mebran donör ve reseptör faz arasına yerleştirilmiştir. Sentetik membran 6 saat pH 7.4 tamponunda ıslatılmıştır. Donör kompartman, etkin maddeli jel formülasyonu, reseptör faz pH 7.4 tamponudur. Sistemden farklı zaman aralıklarında 400 µl örnek alınıp yerine taze tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Alınan örnekler gerekli seyreltmeler yapılarak etkin madde miktarı UV spektrofotometre ile ölçölmüştür. Örnekler 30, 60, 90, 120, 180, 240 ve 360. dakikalarda alınmıştır.

4.6. Kararlılık Çalışmaları

Hazırlanan kitosan hidrojel formülasyonunun kararlılık çalışmaları kapsamında formülasyonlar 4 ± 1 °C, 25 ± 1 °C ve 40 ± 1 °C'lik kararlılık kabinlerine yerleştirilmiştir. Formülasyonlarda 1.Ay, 2.Ay ve 3.Ayda pH, reoloji (0. zaman ve 3. ay) ve etkin madde miktar tayini çalışmaları yapılmıştır.

5. BULGULAR

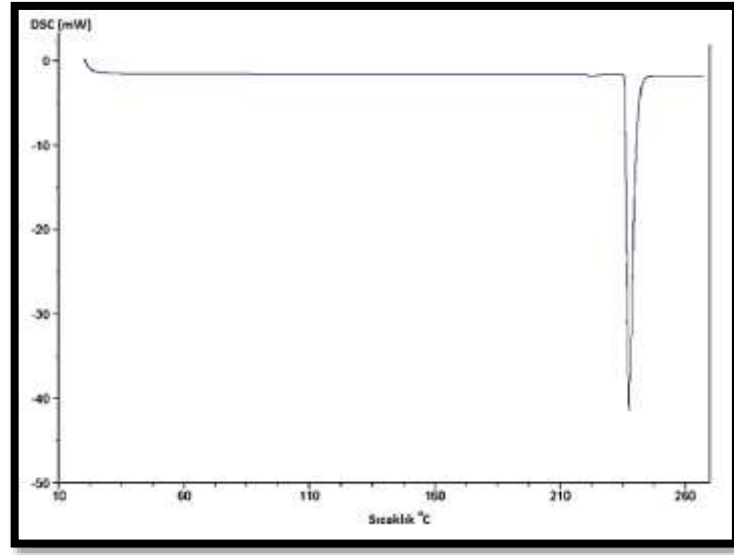
5.1. Kafein ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1 Erime derecesi

Kafeinin erime derecesi ölçülmüş ve 235°C olarak bulunmuştur, literatür ile uyumludur [69].

5.1.2 Termal analiz

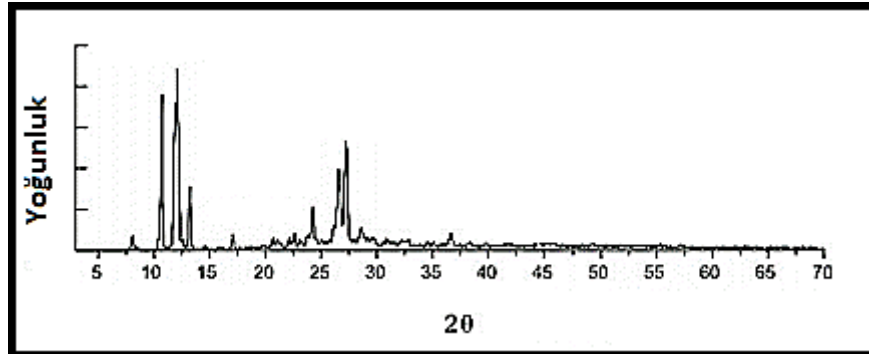
Kafeine ait termogram Şekil 5.1’de sunulmuştur. Etkin maddeye ait spesifik erime piki 235 °C’de gözlenmiştir.



Şekil 5.1. Etkin maddeye ait DSC Termogramı

5.1.3.X-ışını kırınım analizi

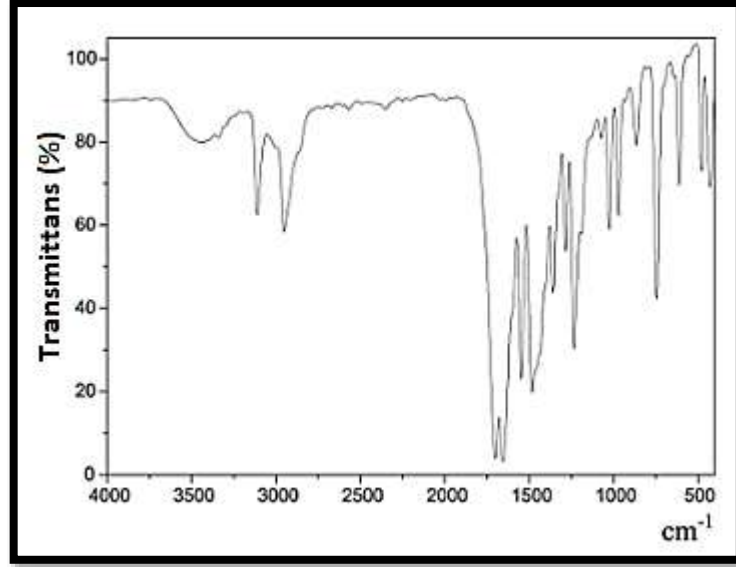
Kafeine ait X-ışını kırınım profili Şekil 5.2’de sunulmuştur.



Şekil 5.2. Kafeine Ait X-ışını kırınım profili

5.1.4. İnfared (FT-IR) analizi

Kafeine ait FT-IR spektrumu Şekil 5.3.'de sunulmuştur.



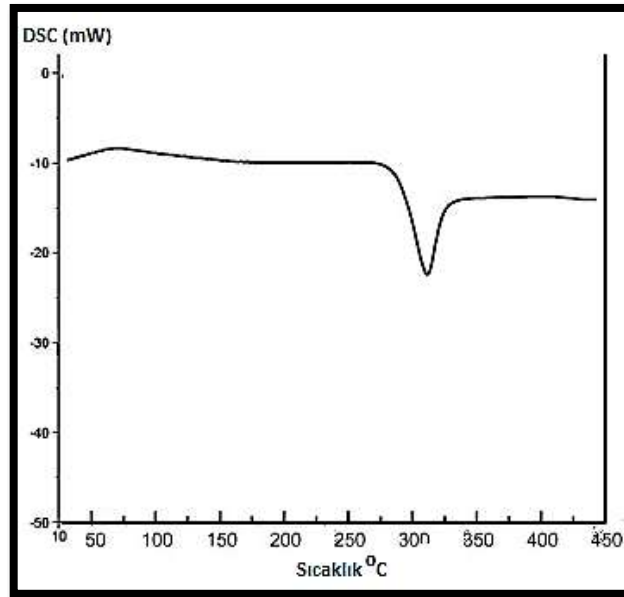
Şekil 5.3. Kafeine ait FT-IR Spektrumu

5.2. Kitosan ile Yapılan Çalışmalar

Optimum formülasyonlar düşük molekül ağırlıklı kitosan (LMWK) ile yapılmıştır ve fizikokimyasal analizlerle yapı aydınlatılmıştır.

5.2.1. Termal analiz

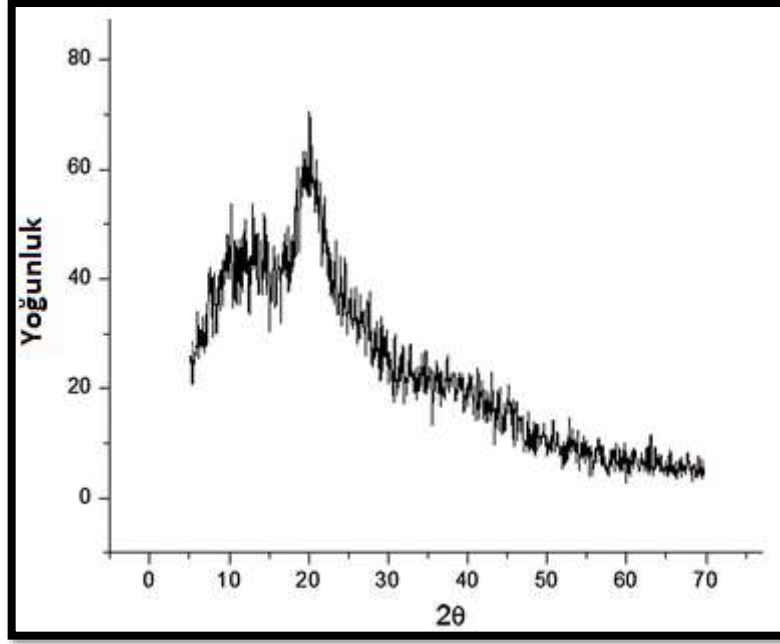
LMWK'a ait termogram Şekil 5.4'de sunulmuştur.



Şekil 5.4. LMWK ait DSC termogramı

5.2.2. X-ışını kırınım analizi

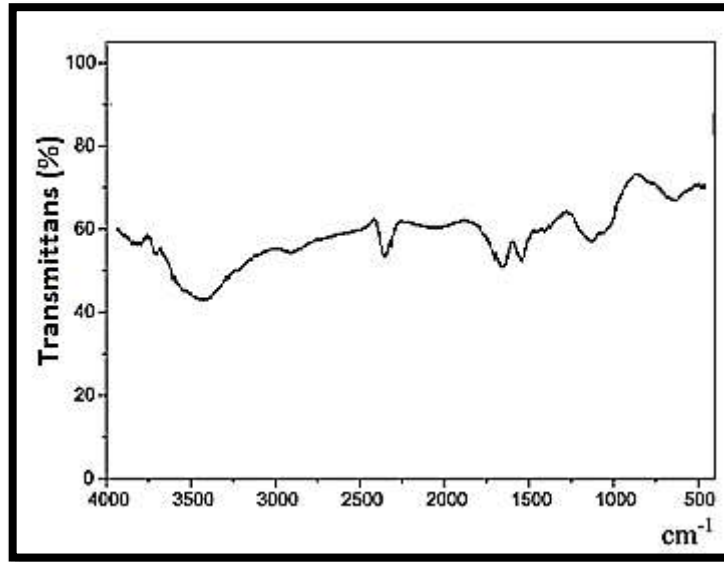
LMWK'a ait X-ışını kırınım profili Şekil 5.5'de sunulmuştur.



Şekil 5.5. LMWK Ait X-ışını kırınım profili

5.2.3. İnfrared (FT-IR) analizi

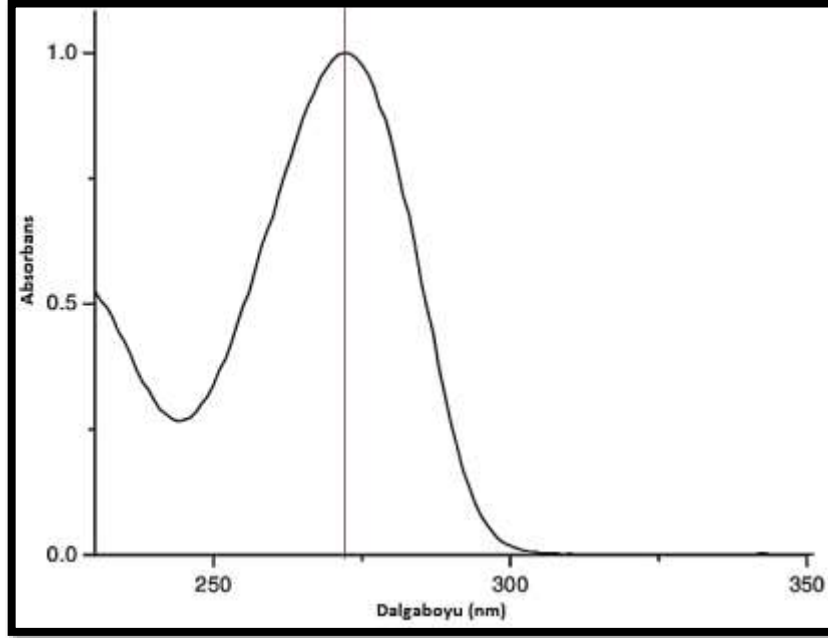
LMWK'a ait FT-IR spektrumu Şekil 5.6'da sunulmuştur.



Şekil 5.6. LMWK ait FT-IR Spektrumu

5.3. Kafeinin Miktar Tayini İçin UV Spektrofotometrik Yöntem Çalışmaları

Kafeinin distile su ortamındaki spektrumu, UV spektrofotometresi ile bölüm 4.3’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Şekil 5.7’de maksimum dalgaboyu 272 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5.7. Kafeine ait distile su ortamındaki UV Spektrumu

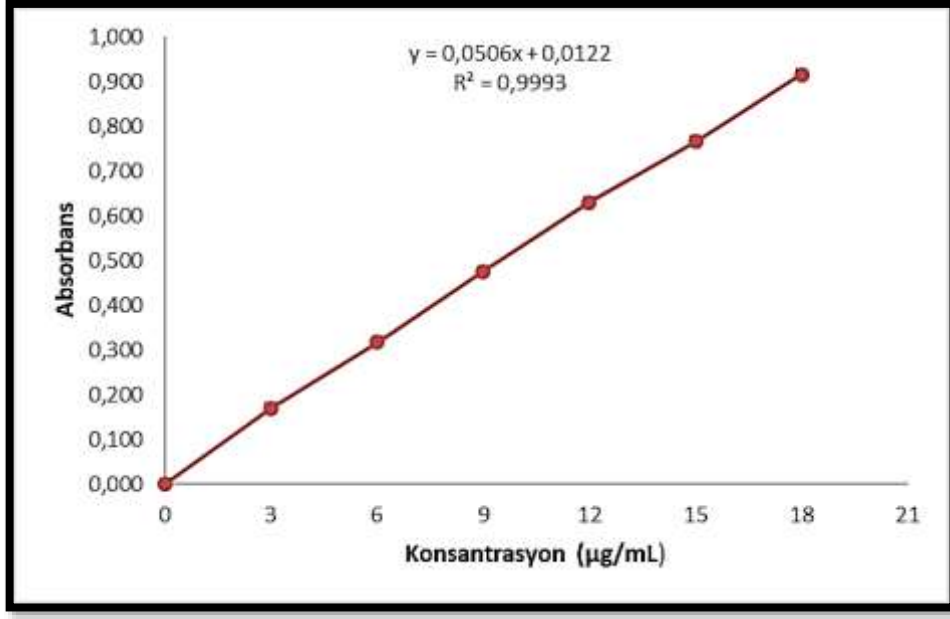
5.3.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları

5.3.1.1. Doğrusallık

Bölüm 4.3.1.1’de açıklandığı şekilde konsantrasyonu 100 µg/mL olan stok çözeltisinden hareketle farklı konsantrasyonlardaki kafein çözeltilerinin konsantrasyona karşı absorbans (ABS) grafikleri çizilmiş (Şekil 5.5) ve bu veriler yardımıyla ortalama değerden hareketle eğri denklemini hesaplanmıştır. 3, 6, 9, 12, 15, 18 µg/mL konsantrasyonlarında 6 farklı örnek alınmıştır. Alınan her örneğin UV spektrofotometrede ölçümü 3 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 5.1. Doğrusallık çalışması için hazırlanan konsantrasyonlar ve absorbans değerleri

Kafein (µg/mL)	ABS-1	ABS-2	ABS-3	ABS-4	ABS-5	ABS-6
3	0.169	0.172	0.168	0.172	0.177	0.174
6	0.312	0.322	0.319	0.318	0.319	0.318
9	0.462	0.481	0.483	0.480	0.477	0.471
12	0.620	0.634	0.635	0.638	0.637	0.633
15	0.760	0.774	0.765	0.769	0.765	0.768
18	0.897	0.925	0.925	0.922	0.910	0.905



Şekil 5.8. Kafeinin distile su ortamındaki standart eğrisi

5.3.1.2. Doğruluk

Bölüm 4.3.1.2’de açıklandığı şekilde stok çözeltilerden hareketle belirlenen referans değer alanından 4, 8, 12 µg/mL konsantrasyonlarında 3 ara değer alınıp kafein miktarının doğruluğunu ispatlamak için UV spektrofotometrede ölçüm yapılmış ve her konsantrasyon için deney 6 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen derişim değerleri doğrusallık çalışmasında elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. Doğruluk çalışması için kabuledilebilirlik sınırı %98-102 (\pm %2) aralığındadır. Yöntemin geri kazanım ve doğruluğu elde edilen sonuçlara göre kanıtlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.2’de sunulmuştur.

Çizelge 5.2. Doğruluk çalışması için hazırlanan konsantrasyonlar ve absorbands değerleri (n=6)

Kafein (µg/mL)	ABS-1	Elde edilen Kafein (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama % Geri Kazanım	Standart Sapma	Varyasyon Katsayısı	%95 Güven Aralığı	Standart Hata
4	0.211	3.928	98.199	99.5160	0.189	1.312	3.261	0.535
	0.211	3.928	98.199					
	0.212	3.947	98.692					
	0.217	4.046	101.162					
	0.216	4.026	100.668					
	0.215	4.007	100.174					
8	0.408	7.819	97.743	98.895	0.388	0.656	1.630	0.268
	0.412	7.898	98.731					
	0.413	7.918	98.978					
	0.413	7.918	98.978					
	0.414	7.938	99.224					
	0.416	7.977	99.718					
12	0.622	12.046	100.390	100.225	0.543	0.147	0.368	0.060
	0.621	12.027	100.225					
	0.620	12.007	100.060					
	0.622	12.046	100.390					
	0.620	12.007	100.060					
	0.621	12.027	100.225					

5.3.1.3. Kesinlik

Bölüm 4.3.1.3’de açıklandığı şekilde kafeinin 3 farklı derişimde çözeltisi hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 farklı günde aynı şartlar altında aynı yöntemle ölçümler alınmıştır. Her konsantrasyon için ölçüm alınan her günde deney 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusalılık çalışmasında elde edilen eşitlik yardımıyla hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik için kabuledilebilirlik sınırı varyasyon katsayısının %2 değerinden az olmasıdır. Kesinlik çalışması sonuçları Çizelge 5.3’de sunulmuştur.

Çizelge 5.3. Kesinlik çalışması için hazırlanan konsantrasyonlar ve absorbands değerleri (n=3)

KONSANTRASYON	5 µg/mL		
	1. Gün ABS	2. Gün ABS	3. Gün ABS
	0.235	0.230	0.235
	0.236	0.238	0.238
	0.238	0.236	0.240
	1. Gün Konsantrasyon	2. Gün Konsantrasyon	3. Gün Konsantrasyon
	4.402	4.303	4.402
	4.422	4.461	4.461
	4.461	4.422	4.501
Ortalama	4.428	4.395	4.455
Standart sapma	0.030	0.082	0.050
RSD	0.681	1.871	1.116
% 95 Güven aralığı	0.075	0.204	0.123
KONSANTRASYON	10 µg/mL		
	1. Gün ABS	2. Gün ABS	3. Gün ABS
	0.492	0.494	0.496
	0.491	0.490	0.493
	0.490	0.499	0.499
	1. Gün Konsantrasyon	2. Gün Konsantrasyon	3. Gün Konsantrasyon
	9.479	9.518	9.558
	9.459	9.439	9.499
	9.439	9.617	9.617
Ortalama	9.459	9.525	9.558
Standart sapma	0.020	0.089	0.059
RSD	0.209	0.935	0.620
% 95 Güven aralığı	0.049	0.221	0.147
KONSANTRASYON	15 µg/mL		
	1. Gün ABS	2. Gün ABS	3. Gün ABS
	0.762	0.772	0.773
	0.767	0.774	0.774
	0.772	0.773	0.773
	1. Gün Konsantrasyon	2. Gün Konsantrasyon	3. Gün Konsantrasyon
	14.812	15.010	15.030
	14.911	15.049	15.049
	15.010	15.030	15.030
Ortalama	14.911	15.030	15.036
Standart sapma	0.099	0.020	0.011
RSD	0.662	0.131	0.076
% 95 Güven aralığı	0.275	0.049	0.028

5.3.1.4. Seçicilik

Bölüm 4.3.1.4'de açıklanan çalışmalar yapılmış ve hazırlanan etkin maddesiz formülasyon absorbands vermemiştir.

5.3.1.5. Duyarlılık

Bölüm 4.3.1.5.'de verilen eşitlikler kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 0.4104 µg.mL⁻¹ ve 1.2436 µg.mL⁻¹ olduğu bulunmuştur. Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en küçük

derişim $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olup hesaplanan LOD ve LOQ değerleri bu değerin altında bulunmuştur.

5.4. Kitosan Jel Formülasyonunun Karakterizasyon Çalışmaları

5.4.1. Formülasyonların pH değeri ölçümü

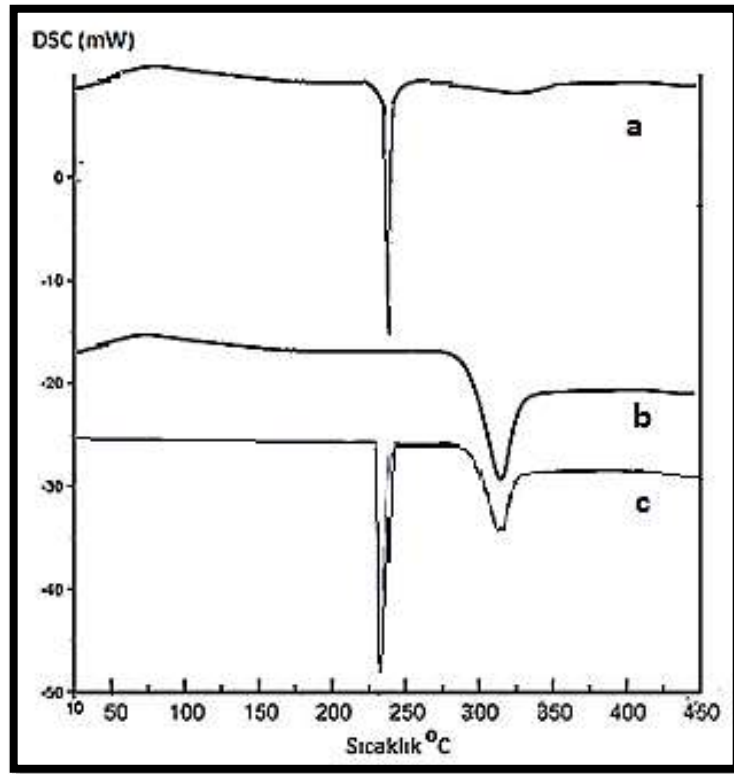
Bölüm 4.5.1.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.4.'de verilmiştir.

Çizelge 5.4. Formülasyonlara ait pH değerleri (n=3)

FORMÜLASYON	pH \pm SH
Plasebo	5.36 ± 0.047
B ₁	5.53 ± 0.047

5.4.2. Formülasyonlarda termal analiz

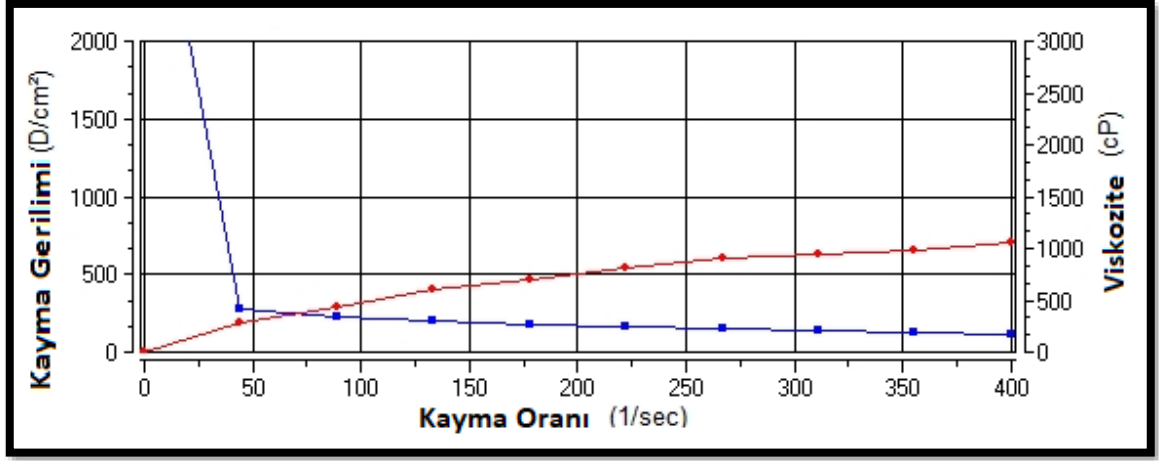
Bölüm 4.5.2.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmış ve sonuçlar Şekil 5.9.'da verilmiştir.



Şekil 5.9. DSC termogramları; a. B₁ Formülasyonu; b. Plasebo; c. Fiziksel karışım

5.4.3. Formülasyonlarda reolojik analiz

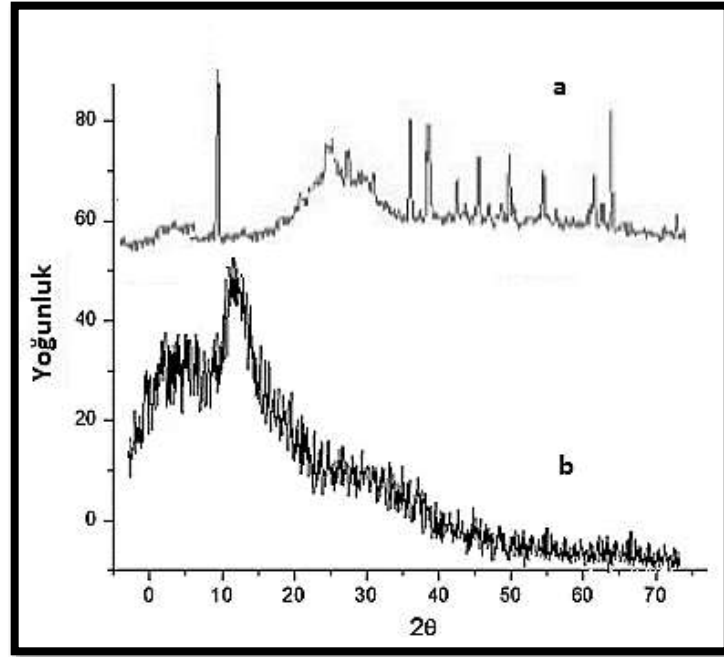
Bölüm 4.5.3.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmış ve sonuçlar Şekil 5.10.'da verilmiştir.



Şekil 5.10.. B₁ Formülasyonuna ait 0. zaman reogramı

5.4.4. X-ışını kırınım analizi

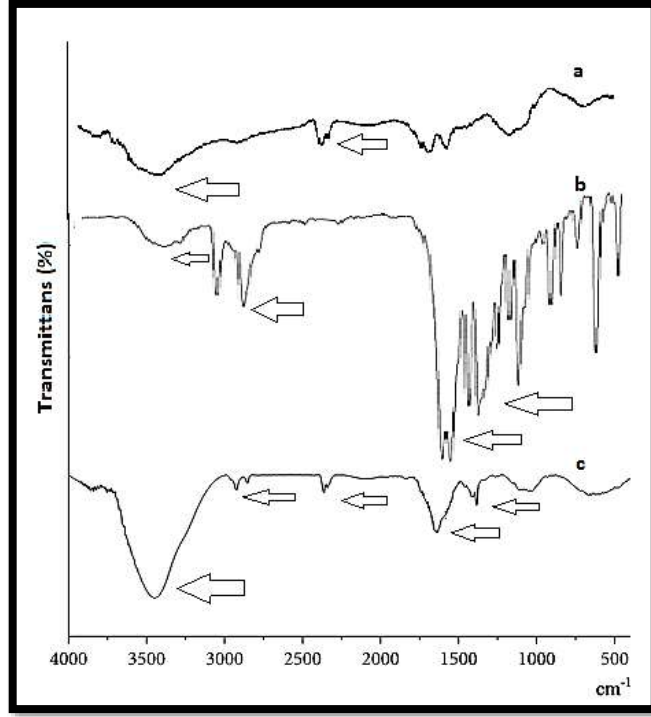
Bölüm 4.5.4.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmış ve sonuçlar Şekil 5.11.'de verilmiştir.



Şekil 5.11. XRD paternleri a. B₁ Formülasyonu; b. Plasebo

5.4.5. İnfrared (FT-IR) analizi

Bölüm 4.5.5.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmış ve sonuçlar Şekil 5.12.'de verilmiştir.



Şekil 5.12. FTIR spektrumları; a. Plasebo; b. Kafein; c. B₁ Formülasyonu

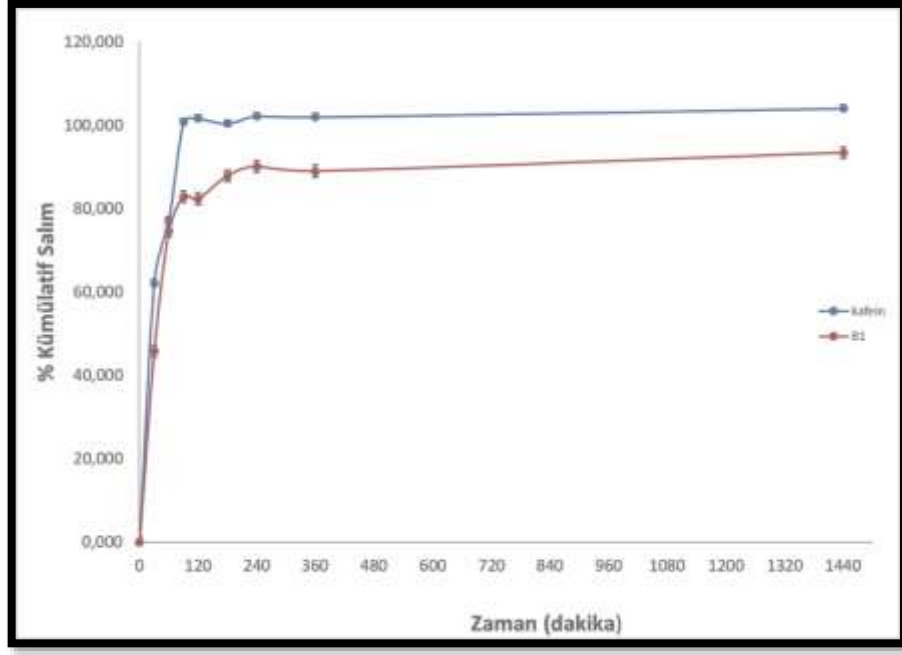
5.4.6. Etkin madde miktar tayini çalışması

Bölüm 4.5.6.'da anlatıldığı şekilde ekstraksiyon yapılmış ve gerekli süzmelerin ardından UV spektrofotometrede ölçüm yapılmış ve elde edilen denklemden etkin madde miktarı bulunmuştur. Formülasyonlara %1 oranında etkin madde eklenmiştir. Analizler neticesinde 0. zamanda hazırlanan formülasyonda %97.55 (eşitlik 5.4) oranında etkin madde varlığı tespit edilmiştir.

$$\text{Yükleme oranı} = \frac{\text{Bulunan etkin madde miktarı}}{\text{Eklenen etkin madde miktarı}} \times 100 \quad (5.4)$$

5.4.7. *In vitro* salım çalışması

Bölüm 4.5.7.'de anlatıldığı şekilde salım deneyleri pH 7.4'de yapılmıştır. Hazırlanan etkin maddeli jel formülasyonunun ve saf etkin maddenin selüloz asetat sentetik membranı kullanılarak Franz difüzyon cihazında salım testleri gerçekleştirilmiştir. Salım profilleri ortalamaları ile salım grafiği çizilmiştir.



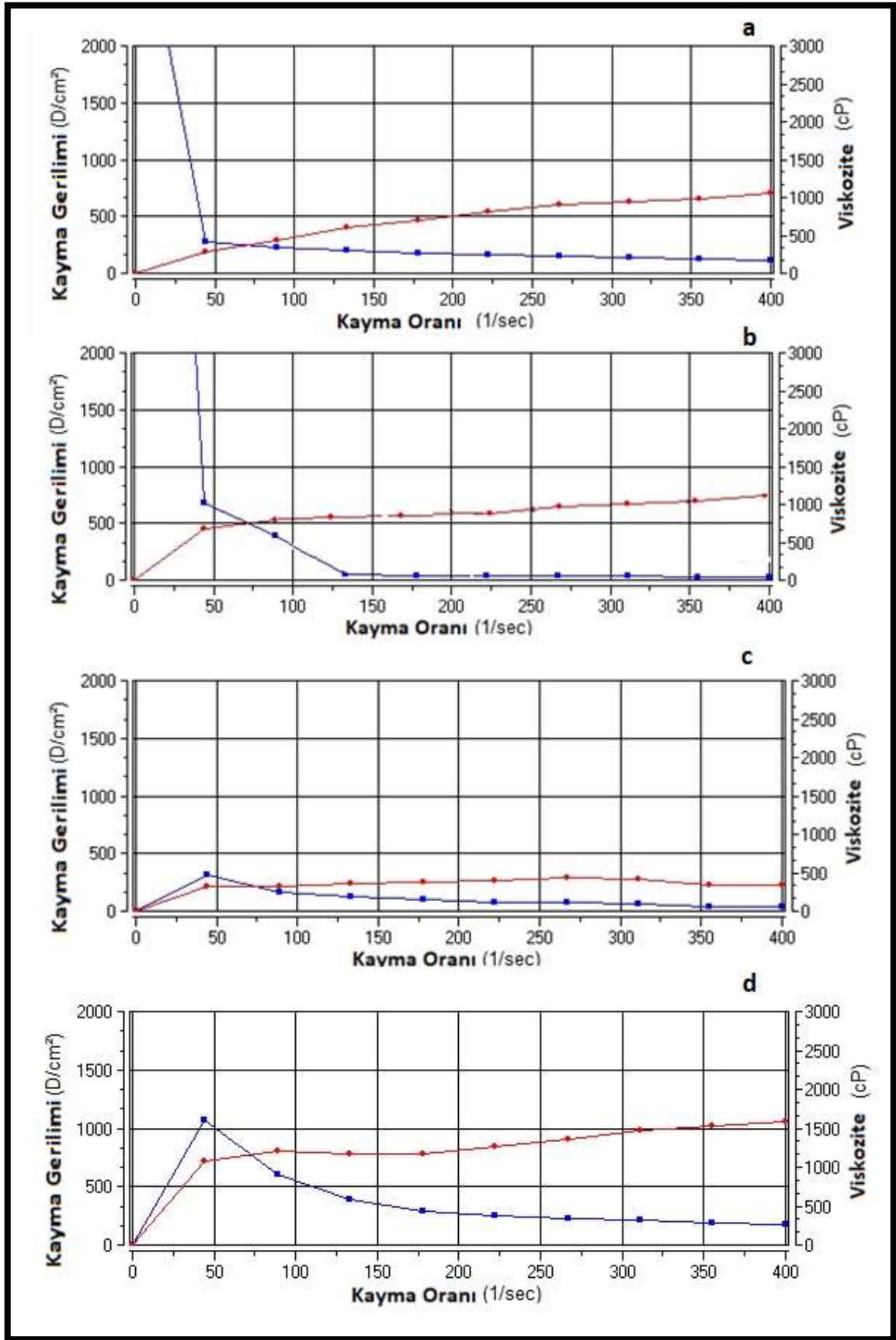
Şekil 5.13. Salım profilleri

5.5. Kararlılık Çalışmaları

Formülasyonlar farklı sıcaklıklarda stabilite kabinlerinde 3 ay boyunca tutulmuş ve gerekli analizler yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.5 ve Şekil 5.14’de verilmiştir.

Çizelge 5.5. Kararlılık testleri

ZAMAN	Etkin Madde Miktarı (%)		
	4°C	25°C	40°C
0. Zaman		97.55	
1. Ay	96.42	97.43	97.28
2. Ay	96.56	97.38	95.46
3. Ay	96.88	97.41	93.58
ZAMAN	pH ± SH		
	4°C	25°C	40°C
0. Zaman		5.53 ± 0.047	
1. Ay	5.54 ± 0.050	5.53 ± 0.041	5.54 ± 0.000
2. Ay	5.53 ± 0.000	5.52 ± 0.047	5.24 ± 0.047
3. Ay	5.54 ± 0.000	5.53 ± 0.047	5.23 ± 0.047



Şekil 5.14. B_1 formülasyonuna ait 3. ay reogramları a. 0. zaman; b. 25 °C; c 40 °C; d. 4 °C

6. TARTIŞMA

Yüksek lisans tez çalışmamızın bu bölümünde, tez çalışması kapsamından kullanılan etkin madde ve yardımcı maddelerin özelliklerine ait elde edilen bulgular ve hazırlanan formülasyona ait *in vitro* çalışmaların bulguları tartışılacaktır.

6.1. Formülasyon ve Karakterizasyon Çalışmaları

Son yıllarda artan araştırma ilgisiyle birlikte doğal bileşikler ve bunların terapötik potansiyeline odaklanılmıştır. Topikal olarak uygulanan farmasötikler ve kozmetiklerin etkinliğinin sağlanması için öncelikle cilt bariyerinden geçebilmesi gerekmektedir [49].

Topikal uygulamada kafein kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Farmasötik ve kozmetik ürünlerde cilt üzerindeki birçok olumlu etkisine bağlı olarak uzun süre, selülit giderici ve yaşlanma karşıtı etkisinden yararlanılmıştır [70].

Cilt yaşlanması kutanöz tabakanın tüm bileşenlerinde meydana gelen değişiklikler olarak tanımlanabilir [71]. Yaşlanma fenomeninde dermal ekstraselüler matriksdeki modifikasyonlar, cildin fiziksel ve mekanik özellikleri ile hücreler ve bileşenler arasındaki etkileşimler önemlidir. Kolajenler ve elastin üç boyutlu bir ağ oluşturarak dermisen mimari temelini oluşturur ve cilt bütünlüğü ve esnekliğinde en önemli rolü üstlenir [72]. Yapılan bir çalışmada kafeinin *in vitro* olarak ciltte fizyolojik denge oluşturduğu, böylece yeni bağ dokusu yapımına izin verdiği ve epidermis kuruluşunu belirgin oranda düşürdüğü gözlenmiştir [70].

Kafein cildin nem içeriğini dengeleyerek yaşlanma karşıtı etkinlik göstermektedir. Stratum korneum'un hidrasyonu, cildin görünümü ve fiziksel özelliklerini iyileştirir [73]. Tez çalışmamızda bu noktadan hareketle %1 kafein içeren formülasyon hazırlanmış ve *in vitro* karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

Kitosan, glikopiranozun doğrusal bir kopolimeridir. Doğadaki en bol karbonhidratlardan biri olan ve çoğunlukla kabukluların dış iskeletinden türetilen doğal bir polisakkarit ve kitinin kısmen deasetillenmiş bir türevidir [74].

Aynı zamanda kitosan, biyolojik olarak yenilenebilirlik, biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyoyumluluk, biyolojik yapışkanlık ve toksik olmama gibi birçok yararlı özelliğe sahiptir [75,76].

Kitosanın, stratum granulozumda bir penetrasyon bariyeri oluşturan epidermal sıkı bağlantı proteinleri ile etkileşimine bağlı olarak cilt penetrasyonunu artırdığı bildirilmiştir [77].

Kozmetik endüstrisinde kitosan, farklı ürünler üretmek için özelleştirilebilir. Cilt bakımı, saç bakımı ve deodorantlar gibi farklı kozmetik alanlarda kullanım için uygundur. Antibakteriyel özelliği sayesinde cilt bakım kremlerinde, şampuanlarda ve saç sprelerinde vazgeçilmez bir bileşendir. Cilde etki eden diğer bileşenleri bağlama özelliğine sahip, cilt yüzeyinde koruyucu nemlendirici ve elastik bir film oluşturma potansiyeli bulunmaktadır [78].

Kitosan bu özellikleri nedeni ile tez çalışmamızda jel formülasyonu hazırlamak için polimer olarak seçilmiştir.

Etkin madde üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Saf kafein, 235 ° C' de tek bir keskin endotermik erime piki göstermektedir, bu da kafeinin kristal özellikte olduğunu ifade etmektedir. Bu pik B₁ formülasyonunda çok azalmış ve etkin maddenin jel formülasyonunda daha çok amorf halde olduğunu ve ilacın jel yapı içinde kitosan polimeri ile kaplandığını kısmen de polimerin dış yüzeyine tutunduğunu ifade etmektedir. Ayrıca kitosanın DSC analizinde amorf yapısından kaynaklı olarak endotermik pik gözlenmemiştir [79, 80].

Hem plasebo formülasyonda hem de B₁ formülasyonunda 40 ila 105 °C aralıklarında endotermik pik kısmende olsa gözlenmiştir, bunun sebebinin formülasyon hazırlanmasında kullanılan asetik asitin çözücüsünün kaybı ile literatürle uyumlu olarak ilişkilendirilmiştir[81].

Hazırlanan formülasyonda kafeinin fiziksel yapısını aydınlatmak için FT-IR ve XRD'nin ortaya çıkardığı bilgiler incelenmiştir. Spesifik olarak, kafein zirveleri 12.08° 'de ve 27.38° de gözlenirken bu karakteristik zirvelerden sadece 27.38 °'deki kırınım B₁ formülasyonu paterninde gözlenebildi. Kafeini kırınım profiline bakıldığında görünen başlıca karakteristik kırınımlar literatüre bağlı olarak izlenmiştir. Kitosan ile hazırlanmış plasebo formülasyonda amorf yapı gözlenmiştir. B₁ formülasyonunun XRD profili incelendiğinde ise kafeinin kaybolmuş bazı keskin pik yapıları, etkin maddenin kitosan polimerinin içine yerleşmiş olduğu ve kısmen de olsa kristal yapının kaybolduğunu düşündürmektedir [82-84].

Tüm FTIR spektrumları 4000-400 cm⁻¹ bölgesinde kaydedilmiştir. Geleneksel kitosan spektrumu saf polimer ve plaseboda net gözlenirken, B₁formülasyonunda ek pikler de elde edilmiştir. Buna göre; amin N-H simetrik titreşime karşılık gelen yaklaşık 3450 cm⁻¹ civarında geniş bir bantı, 2920 ve 2320 cm⁻¹'deki tepe noktaları, karbonhidrat halkası ile simetrik ve asimetrik -CH₂ titreşimleri olarak gözlenmiştir. Absorpsiyon pikleri C=O kaynaklı 1650 cm⁻¹ bantında ve 1545 cm⁻¹ -NH₂ bükülmesi kaynaklı gözlenmiştir. Ayrıca 1000-1200 cm⁻¹ aralığında sakkarit yapısından dolayı simetrik olmayan C-O gerilimi gözlenmektedir [85, 86].

Saf kafeinin FT-IR spektrumu literatürlerle uyumlu olarak C-H metil gruplarının titreşimi kaynaklı 3000-2750 cm⁻¹ aralığında karakteristik tepe noktalarını göstermiştir. 1700-1400 cm⁻¹ aralığında C=O, C=N ve C=C bağlarının titreşimi kaynaklı bantlar gözlenmiştir. B₁ formülasyonu FTIR spektrumu da karmaşık etkileşimlerin olmadığını gösteren, yeni zirveler veya zirve konumunda fark edilir kaymalar görünmeyen tüm bileşenlerin toplamıdır. B₁ formülasyonuna ait spektrumda kitosan ve kafein arasındaki etkileşime bağlı olarak 3400 cm⁻¹ bantı -OH tepe noktası kaynaklı ciddi genişleme göstermiştir.

1700 cm⁻¹'de karbonili gösteren yeni bir tepe belirlenmiştir bu tepe kafeinde bulunan C = O grubu kaynaklıdır. Ek olarak 1320 cm⁻¹ bantında kafein kaynaklı C-N bükülmesi B₁ formülasyonunda 1390 cm⁻¹ bantına kaymıştır. Bu da bize kafeinin C=O grubu ile kitosanın amid grubu arasında etkileşim olduğunu ve kafeinin kitosana başarıyla yüklendiğini göstermektedir [84 ,87, 88].

Etkin maddeli formülasyonda sıfırncı zamanda ve kararlılık testleri boyunca pH ölçümü yapılmıştır. Epidermis, özellikle stratum corneum, su kaybına karşı koruma sağlar, mikroorganizmaların girişini engelleyen bir bariyer görevi görür ve 4 ile 6.5 arasında değişen asidik bir pH değerine sahiptir [89, 90]. Hazırlanmış olan formülasyon kararlılık süresi boyunca bu değer alanında sabit kalmıştır. Kararlılık testlerinde pH değerinde meydana gelen değişim istatistiksek olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

B₁ formülasyonunda sıfırncı zamanda ve kararlılık testinin sonunda reolojik analiz yapılmıştır. B₁ formülasyonu pseudoplastik akış göstermiştir. Kararlılık testleri sonucunda 25 °C’de saklanan formülasyonun reolojisi değişmezken 4 °C’de saklanan formülasyonda viskozite artarken akış tipi aynı kalmıştır. 40 °C’de saklanan formülasyonda da akış tipi korunurken viskozite azalmıştır. Sıcaklık arttıkça viskozite düşmektedir [91, 92]. Pseudoplastik akışta, çok az kayma gerilimi ile bile yer çekimi etkisi ile akış olur. Eczacılıkta kullanılan jel, müsilaaj, emülsiyon gibi sistemlerin çoğunda bu tip akış görülür. Etki eden kuvvetin artırılmasıyla başlangıçta zor olan akış giderek ideal akış özelliği kazanır [93].

Sıfırncı zamanda ve kararlılık çalışması boyunca etkin madde miktarı tespit çalışması yapılmıştır. Verilerde istatistiksel olarak (two-way ANOVA) testi kullanılmıştır. 3 aylık kararlılık çalışması sonucunda etkin madde miktarında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir ($p> 0.05$).

Formülasyon ve saf etkin madde karşılaştırmalı olarak franz difüzyon cihazı kullanılarak salım açısından değerlendirilmiştir. Saf etkin madde 90. Dakikada %100.384’e ulaşırken, B₁ formülasyonuna salım aynı dakikada %74.83 ve salım çalışmasının 1440. dakikasında % 93.89 bulunmuştur. Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere etkin madde salım hızı uzatılmıştır. Salımın ilk 1 saatinde patlama etkisi gözlenmiş veya daha hızlı salınım gözlenmiş, ardından kafein daha düşük bir hızda daha uzun bir süre salınmıştır [94, 95].

6.2. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon

Kafein ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, miktar tayini ve salım çalışmaları için farklı spektrofotometrik yöntemlerin (YBSK, UPLC ve UV) kullanıldığı gözlenmiştir [96-98].

Tez çalışmamızda UV spektrofotometre ile analizler yapılmıştır. Spektrofotometre hızlı ve basit bir yöntem olmasına rağmen, spektral örtüşme görülmesi mümkündür (Zhang ve diğerleri, 2005). YBSK yönteminde pahalı ekipmanların kullanılması, FT kızılötesi, Raman ve NIR yansıma spektrometresi gibi diğer yöntemler de, kafein ölçümü için eşit derecede çok yönlüdür ve pahalı kimyasallar gerektirmez, ancak bu tür cihazlar pahalıdır ve laboratuvarımızda bulunmamaktadır [99, 100].

Kafeinin sudaki UV absorpsiyon spektrumunun oda sıcaklığında 243–302 nm aralığında olduğu bulunmuştur. Kafeinin spektral yoğunluğunun 302 nm’den daha büyük dalga boyunda sıfıra düştüğü, diğer yandan 243 nm’nin altındaki bir dalga boyunda yeni bir pik absorbansın olduğu görülmüştür. 272 nm dalga boyunda ideal şiddet ve morfolojide kısa sürede pik elde edilmiştir. Bulgular literatürler ile uyumludur [44, 96].

Doğrusallık çalışması sonucunda r^2 0.9993 olarak bulunmuş ve bu değere bağlı olarak sistemin doğrusallığı ispatlanmıştır. Absorbans konsantrasyonla doğru orantılıdır ve başka bir deyişle Lambert-Beer yasasına uyumludur. Birbirini izleyen üç ayrı günde yapılan kesinlik çalışmasında geliştirilen yöntemin varyasyon katsayısı %2 değerinin altında bulunmuş ve yöntemin kesinliği ispatlanmıştır. Seçicilik için plasebo formülasyon ile çalışma yapılmış ve herhangi bir girişim veya pik olmadığı gözlenmiştir. Farklı derişimlerle yapılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmalarında elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır. Kullandığımız yöntemde etkin madde saptama sınırı hesaplanmış ve çalışmalar bu sınırlar dahilinde ilerlemiştir [44, 101, 102].

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda kafein yüklü kitosan jel hazırlanmış ve *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. DSC, FTIR ve XRD analizleri ile fizikokimyasal yapı aydınlatılmıştır. UV spektrofotometre üzerinde geliştirilen güncel yöntemler nispeten kolay, hızlı, ucuz ve kafein içeriğinin belirlenmesi için oldukça hassastır. Ayrıca, analizi önerilen yöntemi gerçekleştirmek için gerekli kimyasallar ve ekipmanlar, genel olarak tüm laboratuvarlarda bulunanlardır. Formülasyonun 3 aylık kararlılık testi sonucunda etkin madde miktarı, pH ve reolojisinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Lakin yapılan analizler neticesinde formülasyonun 25 °C'de saklanması uygun bulunmuştur. B₁ formülasyonunun kararlı bir formülasyon olduğu gösterilmiştir. Kafein için geliştirilen yöntem kafeinin analitik miktar tayini için seçici ve doğru bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan salım deneyleri saf etkin maddeye göre salım hızının B₁ formülasyonu ile uzatıldığı gözlenmiştir. Kafein içeren jel formülasyonun etkili bir cilt yaşlanması karşıtı ürünü olduğunu söyleyebilmek için *in vivo* insan gönüllülerde test yapılması şarttır. Yapılmış olan tez çalışmamız formülasyonun kararlı ve cilt ile uyumlu bir formülasyon olduğunu göstermektedir. Kitosan jel kafeinin topik kullanımı için uygun bir formülasyondur. Elde edilen sonuçlar ilerleyen zamanlarda planlanan *in vivo* insan gönüllü deneyleri için önemli bir parametredir.

KAYNAKÇA

- [1] İmamoğlu, Ö. (2011). Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 68(4), 215-222.
- [2] Özel, H. (2013). *Kabuklu deniz ürünleri artıklarından endüstriyel ölçekte kitin-kitosan üretimi*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [3] Kurtuluş, G., & Vardar, F. Kitosanın Özellikleri, Uygulama Alanları, Bitki Sistemlerine Etkileri. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 32(3), 258-269.
- [4] He, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Hu, L., & Li, P. (2016). The production of fully deacetylated chitosan by compression method. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 75-81.
- [5] Tokatlı, K., & Demirdöven, A. (2015). Kitosan ve kitosan bazlı yenilebilir film uygulamaları. *Akademik Gıda*, 13(4), 348-353.
- [6] Sezer, S. (2009). *PEG ile stabilize edilmiş kollajen-kitosan hidrojellerin biyomalzeme olarak geliştirilmesi*. Yayımlanmamış Doktora tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [7] Özdemir, Z. (2014). Kitin, kitosanın fonksiyonel özellikleri ve kullanım alanları. *Türkiye Kimya Derneği, (Ekim)*, 104-117.
- [8] Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174.
- [9] Öztekin, M. (2017). *Kitosan Nanopartiküllerine Ve Kitosanhallsit Nanokompozitlerine Metronidazole Yüklenmesi, Salınımı Ve Adsorpsiyonunun İncelenmesi*. Yayımlanmamış yüksek lisans tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [10] Cesur, S., Köroğlu, C. ve Sırma, B. (2016). Kitosan, özellikleri, üretimi ve uygulama alanları. *Polikom, International Workshop On Special Topics On Polymeric Composites*'de sunulan poster. İzmir: Ege Üniversitesi.
- [11] Demir, A., & Seventekin, N. (2009). Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2), 92-103.
- [12] Yıldırım, Z., Öncül, N., & Yıldırım, M. (2015). Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(1), 19-36.
- [13] Hamed, H., Moradi, S., Hudson, S. M., & Tonelli, A. E. (2018). Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 199, 445-460.

- [14] Perinelli, D. R., Fagioli, L., Campana, R., Lam, J. K., Baffone, W., Palmieri, G. F., Bonacucina, G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117, 8-20.
- [15] Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., & d'Ayala, G. G. (2020). Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115839.
- [16] Erden, N., & Çelebi, N. (1990). Kitin ve Kitozanın Farmasötik Teknolojideki Uygulanışı. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 277-287.
- [17] Bezir, N. Ç., Bozkurt, B., Evcin, A., Özcan, B., Kır, E., Akarca, G., & Ceylan, O. (2019, November). Enhanced antibacterial activity of silver-doped chitosan nanofibers. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2178, No. 1, p. 030003). AIP Publishing LLC.
- [18] Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- [19] Sah, A. K., Dewangan, M., & Suresh, P. K. (2019). Potential of chitosan-based carrier for periodontal drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 185-198.
- [20] Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 273-286.
- [21] Bayraktar, İ. (2013). *Manyetik Hidrojellerin sentezi, karakterizasyonu ve adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [22] Gökalp, A. (2009). *Gözenekli, iyonik süper absorban polimer jellerin hazırlanması ve karakterizasyonu*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [23] Tanrıverdi, F. (2007). *Bazı hidrojellerin sentezi ve şişme özelliklerinin incelenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [24] Sudhakar, C. K., Upadhyay, N., Jain, A., Verma, A., Charyulu, R. N., & Jain, S. (2015). Hydrogels—Promising Candidates for Tissue Engineering. In *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* (pp. 77-94). William Andrew Publishing.
- [25] Singh, M. R., Patel, S., & Singh, D. (2016). Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering. In *Nanobiomaterials in soft tissue engineering* (pp. 231-260). William Andrew Publishing.
- [26] Gulrez, S. K. Saphwan Al-Assaf and Glyn O Phillips (2011). Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-From Analysis and Modeling to Technology

Applications, Prof. Angelo Carpi (Ed.), ISBN: 978-953-307-268-5. *InTech*, 10(24553), 117-150.

[27] Sop, E. S. (2013). Doku Genişletme Amaçlı Hidrojel Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Kinetiği. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[28] Heckhausen, J., Wrosch, C., & Schulz, R. (2019). Agency and motivation in adulthood and old age. *Annual Review of Psychology*, 70, 191-217.

[29] Duyar, İ. (2005). İnsanda yaşlılığın evrimi. *Türk Geriatri Dergisi*, 8(4), 209-214.

[30] Tangül, Ş. E. N. Skin aging and importance of antioxidants. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(1), 36-53.

[31] Aksoy, G. G. (2018). Yaşlanan Deride Pigmentasyon Değişiklikleri ve Tedavisi. *Türkiye Klinikleri Kozmetik Dermatoloji-Özel Konular*, 11(2), 31-35.

[32] Algın Yapar, E, Tuncay Tanrıverdi , S. (2016). Yaşlanma karşıtı kozmetik yaklaşımlar ve ürün bileşenleri. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 5: 99-109.

[33] Joodaki, H., & Panzer, M. B. (2018). Skin mechanical properties and modeling: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 232(4), 323-343.

[34] Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 211(2), 241-251.

[35] http-1: http://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/tebakademi/ilac_disi/2.pdf (Erişim tarihi: 21.10.2020)

[36] Bayrak, S., & Akın, S. Yaşlılarda Cilt Sorunları ve Bakımı. *Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hemşirelik Dergisi*, 1(3), 215-220.

[37] http-2: <https://silo.tips/download/deri-yalanmas-erturul-h-aydemir> (Erişim tarihi: 21.10.2020)

[38] ŞEN, T. Deri yaşlanması ve antioksidanların önemi.

[39] Keleş, F. (2011). Kafein. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(1-4).

[40]http-3: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/75567/mod_resource/content/0/12.hafta.pdf (Erişim tarihi: 21.10.2020)

[41] Puglia, C., Offerta, A., Tirendi, G. G., Tarico, M. S., Curreri, S., Bonina, F., & Perrotta, R. E. (2016). Design of solid lipid nanoparticles for caffeine topical administration. *Drug Delivery*, 23(1), 36-40.

- [42] Schnitzler, E., Kobelnik, M. G. F. C., Sotelo, G. F. C., Bannach, G., & Ionashiro, M. (2004). Thermoanalytical study of purine derivatives compounds. *Eclética Química*, 29(1), 71-78.
- [43] Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S., Sethi, V. K., Shahi, A. K., Taneja, S. C., Singh, J. (2008). An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chemico-biological interactions*, 171(3), 332-347.
- [44] Atomssa, T., & Gholap, A. V. (2011). Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using uv-visible spectrometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5(1), 1-8. [45] Sivamani, R. K., Jagdeo, J. R., Elsner, P., & Maibach, H. I. (Eds.). (2015). *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*. CRC Press.
- [46] Santos, T. C., Oliveira, M. J. A., & Lugão, A. B. (2017). Synthesis and characterization of polymeric hydrogel containing caffeine for cosmeceutical applications. *International Nuclear Atlantic Conference – INAC toplantisi’nda sunulan bildiri*. Brezilya.
- [47] Saltan, F. Z., & Kaya, H. (2018). Kahve: Bir Farmakognozük Derleme. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(3), 279-289.
- [48] Bessada, S. M., C Alves, R., & PP Oliveira, M. B. (2018). Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics*, 5(1), 5.
- [49] Rodrigues, F., Alves, A. C., Nunes, C., Sarmiento, B., Amaral, M. H., Reis, S., & Oliveira, M. B. P. (2016). Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option?. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1-2), 496-503.
- [50] Campa, M., & Baron, E. (2018). Anti-aging effects of select botanicals: scientific evidence and current trends. *Cosmetics*, 5(3), 54.
- [51] Dias, M., Farinha, A., Faustino, E., Hadgraft, J., Pais, J., & Toscano, C. (1999). Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 182(1), 41-47.
- [52] Kim, C., Shim, J., Han, S., & Chang, I. (2002). The skin-permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient. *Journal of Cosmetic Science*, 53(6), 363-374.
- [53] Rosado, C., Tokunaga, V. K., Sauce, R., de Oliveira, C. A., Sarruf, F. D., Parise-Filho, R., Baby, A. R. (2019). Another reason for using caffeine in dermocosmetics: sunscreen adjuvant. *Frontiers in Physiology*, 10, 519.
- [54] Ahmadraji, F., & Shatalebi, M. A. (2015). Evaluation of the clinical efficacy and safety of an eye counter pad containing caffeine and vitamin K in emulsified Emu oil base. *Advanced Biomedical Research*, 4(1), 10-16.

- [69] Schnitzler, E., Kobelnik, M. G. F. C., Sotelo, G. F. C., Bannach, G., & Ionashiro, M. (2004). Thermoanalytical study of purine derivatives compounds. *Eclética Química*, 29(1), 71-78.
- [70] Del Carmen Velazquez Pereda, M., de Campos Dieamant, G., Eberlin, S., Nogueira, C., Colombi, D., Di Stasi, L. C., & De Souza Queiroz, M. L. (2009). Effect of green Coffea arabica L. seed oil on extracellular matrix components and water-channel expression in in vitro and ex vivo human skin models. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8(1), 56-62.
- [71] Giacomoni, P. U., & Rein, G. (2001). Factors of skin ageing share common mechanisms. *Biogerontology*, 2(4), 219-229.
- [72] Robert, L., & Labat-Robert, J. (2000). Aging of connective tissues: from genetic to epigenetic mechanisms. *Biogerontology*, 1(2), 123-131.
- [73] Hara, M., Ma, T., & Verkman, A. S. (2002). Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46616-46621.
- [74] Jimtaisong, A., & Saewan, N. (2014). Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(1), 12-21.
- [75] Kumirska, J., Weinhold, M. X., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2011). Biomedical activity of chitin/chitosan based materials—influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. *Polymers*, 3(4), 1875-1901.
- [76] Aranaz, I., Acosta, N., Civera, C., Elorza, B., Mingo, J., Castro, C., ... & Heras Caballero, A. (2018). Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. *Polymers*, 10(2), 213.
- [77] Valenta, C., & Auner, B. G. (2004). The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 279-289.
- [78] Bansal, V., Sharma, P. K., Sharma, N., Pal, O. P., & Malviya, R. (2011). Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advances in Biological Research*, 5(1), 28-37.
- [79] Márquez, A. G., Hidalgo, T., Lana, H., Cunha, D., Blanco-Prieto, M. J., Álvarez-Lorenzo, C., Horcajada, P. (2016). Biocompatible polymer–metal–organic framework composite patches for cutaneous administration of cosmetic molecules. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(43), 7031-7040.
- [80] Samah, N. H. A., & Heard, C. M. (2013). Enhanced in vitro transdermal delivery of caffeine using a temperature-and pH-sensitive nanogel, poly (NIPAM-co- AAc). *International Journal of Pharmaceutics*, 453(2), 630-640.

- [81] Ruiz-Caro, R., & Veiga-Ochoa, M. D. (2009). Characterization and dissolution study of chitosan freeze-dried systems for drug controlled release. *Molecules*, *14*(11), 4370-4386.
- [82] Hamishehkar, H., Shokri, J., Fallahi, S., Jahangiri, A., Ghanbarzadeh, S., & Kouhsoltani, M. (2015). Histopathological evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles in efficient treatment of cellulite. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *41*(10), 1640-1646.
- [83] Dangol, M., Kim, S., Li, C. G., Lahiji, S. F., Jang, M., Ma, Y., Jung, H. (2017). Anti-obesity effect of a novel caffeine-loaded dissolving microneedle patch in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Journal of Controlled Release*, *265*, 41-47.
- [84] Hassan, A. N., Sahudin, S. H. A. R. I. Z. A., Hussain, Z. A. H. I. D., Hussain, M. U. M. T. A. Z., & Hussain, M. (2018). Self-assembled chitosan nanoparticles for percutaneous delivery of caffeine: Preparation, characterization and in vitro release studies. *International Journal of Applied Pharmaceuticals*, *10*(4), 172-185.
- [85] Damiri, F., Bachra, Y., Bounacir, C., Laaraibi, A., & Berrada, M. (2020). Synthesis and Characterization of Lyophilized Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked with Benzaldehyde for Controlled Drug Release. *Journal of Chemistry*, *2020*, 1-10.
- [86] Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, *8*(8), 2533-2541.
- [87] Silva, N. H., Drumond, I., Almeida, I. F., Costa, P., Rosado, C. F., Neto, C. P., Silvestre, A. J. (2014). Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: a potential innovative system for cellulite treatment. *Cellulose*, *21*(1), 665-674.
- [88] Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., & Fu, S. (2005). Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, *295*(1-2), 235-245.
- [89] Elias, P. M. (1988). Structure and function of the stratum corneum permeability barrier. *Drug Development Research*, *13*(2-3), 97-105.
- [90] Yosipovitch, G., Xiong, G. L., Haus, E., Sackett-Lundeen, L., Ashkenazi, I., & Maibach, H. I. (1998). Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *Journal of Investigative Dermatology*, *110*(1), 20-23.
- [91] Barry, B. W., & Meyer, M. C. (1979). The rheological properties of carbopol gels I. Continuous shear and creep properties of carbopol gels. *International Journal of Pharmaceutics*, *2*(1), 1-25.

- [92] Cheng, H., Wu, S., Li, H., & Zhang, X. (2020). Influence of time and temperature on rheology and flow performance of cemented paste backfill. *Construction and Building Materials*, 231, 117117.
- [93] Boufas, S., Benhamza, M. E. H., Seghir, B. B., & Hadria, F. (2020). Synthesis and Characterization of Chitosan/Carrageenan/Hydroxyethyl cellulose blended gels. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 13(3), 209-215.
- [94] Alemdaroğlu, C., Değim, Z., Çelebi, N., Zor, F., Öztürk, S., & Erdoğan, D. (2006). An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, 32(3), 319-327.
- [95] Ruel-Gariepy, E., Chenite, A., Chaput, C., Guirguis, S., & Leroux, J. C. (2000). Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 89-98.
- [96] Belay, A., Ture, K., Redi, M., & Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, 108(1), 310-315.
- [97] Fernandez, P. L., Martin, M. J., Gonzalez, A. G., & Pablos, F. (2000). HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst*, 125(3), 421-425.
- [98] Pan, W. (2011). Detection of caffeine from coffee by using UPLC methods. *China Tropical Medicine*, 11, 1118-1119.
- [99] Zhang, Q. L., Lian, H. Z., Wang, W. H., & Chen, H. Y. (2005). Separation of caffeine and theophylline in poly (dimethylsiloxane) microchannel electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1098(1-2), 172-176.
- [100] Alpdoğan, G., Karabina, K., & Sungur, S. (2002). Derivative spectrophotometric determination of caffeine in some beverages. *Turkish Journal of Chemistry*, 26(2), 295-302.
- [101] Ahmad Bhawani, S., Fong, S. S., & Mohamad Ibrahim, M. N. (2015). Spectrophotometric analysis of caffeine. *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2015, Article ID 170239, 1-7.
- [102] Pan, H. B., Zhang, D., Li, B., Wu, Y. Y., & Tu, Y. Y. (2017). A rapid UPLC method for simultaneous analysis of caffeine and 13 index polyphenols in black tea. *Journal of Chromatographic Science*, 55(5), 495-496.