

**ANTIOKSİDAN VE ANTIİNFLAMATUVAR ETKİLİ KİTOSAN BAZLI
JELLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE HET-CAM İLE
ANTIİNFLAMATUVAR POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nurlan ISMAILOVI

Eskişehir 2022

**ANTIÖKSİDAN VE ANTIİNFLAMATUVAR ETKİLİ KİTOSAN BAZLI
JELLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE HET-CAM İLE
ANTIİNFLAMATUVAR POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Nurlan ISMAILOVI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurlan ISMAILOVI'nin "Antioksidan ve antiinflamatuvar etkili kitosan bazlı jellerin hazırlanması, karakterizasyonu ve HET-CAM ile antiinflamatuvar potansiyellerinin belirlenmesi" başlıklı tezi 24.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı- Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK	
Üye	: Prof. Dr. Müzeyyen Demirel	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Umay M. Güven	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

ANTIÖKSİDAN VE ANTIİNFLAMATUVAR ETKİLİ KİTOSAN BAZLI JELLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE HET-CAM İLE ANTI İNFLAMATUVAR POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Nurlan ISMAILOVI

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Kitosan jeli antiinflamatuvar ve antioksidan ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Türkiye florası için endemik bitki olan *Helichrysum pamphylicum*, diğer *Helichrysum* türleri gibi flavanoitler ve floroglusinol türevleri başta olmakla fenolik bileşikler açısından oldukça zengindir. Fenolik bileşiklerin, antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör ve antimikrobiyal etki gibi özellikleri dahil birçok fizyolojik etkileri bilinmektedir. Bu tez çalışmasında *Helichrysum pamphylicum* Davis et Kupicha türüne ait toprak üstü kısımlardan elde edilen metanol ekstresini içeren kitosan bazlı jel formülasyonu başarı ile hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Antioksidan aktivite sonuçlarına göre hazırlanmış formülasyon belirgin bir şekilde DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} kation renksizleştirici ve Metal şelatlayıcı antioksidan aktivite gösterirken zayıf redükleyici antioksidan potansiyel göstermiştir. Kitosan jeli ve *H. Pamphylicum* metanol ekstresinin sinerjistik etki ile kuvvetli antiinflamatuvar etki gösterdiği HET-CAM yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada hem antioksidan hem de antiinflamatuvar tedavide kullanılabilecek *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi içeren kitosan bazlı jellerin başarılı bir şekilde formüle edilip karakterize edildiği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: *H. pamphylicum*, Kitosan, Antioksidan, Antiinflamatuvar, HET-CAM.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERISATION OF CHITOSAN-BASED GELS WITH ANTIOXIDANT AND ANTI-IMFLAMMATORY EFFECTS AND DETERMINATION OF THEIR ANTI-IMFLAMMATORY POTENTIAL WITH HET-CAM

Nurlan ISMAILOVI

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

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

Chitosan gel is widely used as an anti-inflammatory and antioxidant agent. *Helichrysum pamphylicum*, which is an endemic plant for the flora of Turkey, is very rich in phenolic compounds, especially in flavanoids and phloroglucinol derivatives, like other plant species from the *Helichrysum* genus. Many physiological effects of phenolic compounds are known, including properties such as antioxidant, antitumor, anti-inflammatory and antimicrobial effects. In this thesis, a chitosan-based gel formulation containing methanol extract obtained from the aerial parts of *Helichrysum pamphylicum* Davis et Kupicha was successfully prepared and characterized. According to the antioxidant activity results the prepared formulation showed significant DPPH free radical sweeper, ABTS^{•+} cation decolorizing and metal chelating antioxidant activity, while weak reducing antioxidant potential. It was determined using the HET-CAM method that chitosan gel and *H. Pamphylicum* methanol extract showed strong anti-inflammatory effect with synergistic effect. In conclusion, in this study, it can be said that chitosan-based gels containing *Helichrysum pamphylicum* methanol extract, which can be used in both antioxidant and anti-inflammatory treatment, were successfully formulated and characterized.

Keywords: *H. pamphylicum*, Chitosan, Antioxidant, Anti-inflammatory, HET-CAM.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmamın planlamasından sonulandırılmasına kadar bütn aőamalarda bana desteğini esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim boyunca bana değerli katkıları olan saygıdeğer danıőmanım Sayın Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Deneylerim için gerekli olan bitki ekstresini sağlayan, aynı zamanda *in vivo* antiinflamatuvar çalıőmalarımda bana büyük yardımları dokunan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hlyla Tuba KIYAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgileriyle bana ışık tutan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma teőekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, her zaman arkamda duran değerli aileme teőekkürlerimi sunuyorum.

24/06/2022

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
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Kitosan	2
2.1.1. Kitosanın yapısı	2
2.1.2. Kitosanın fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri	3
2.1.2.1. Molekül ağırlığı.....	4
2.1.2.2. Deasetilasyon derecesi	5
2.1.2.3. Viskozite.....	7
2.1.2.4. Çözünürlük.....	7
2.1.3. Kitosan üretimi için kaynaklar	7
2.1.4. Kitosanın hazırlanma yöntemleri	7
2.1.4.1. Kuru kitlenin işlenmesi	7
2.1.4.2. Deasetilasyon	8
2.1.4.3. Deproteinizasyon	8
2.1.4.4. Demineralizasyon.....	8

2.2. Deri ve Anatomisi	10
2.2.1. Derinin Yapısı.....	10
2.2.1.1. Epidermis	11
2.2.1.1.1. Stratum corneum	12
2.2.1.2. Dermis.....	12
2.2.1.3. Hipodermis	12
2.2.2. Deriden ilaç geçiş yolları.....	12
2.3. Topikal uygulama	13
2.3.1. Topikal dozaj formlarının katkı maddeleri.....	16
2.3.2. Topikal ilaç salım sistemleri	17
2.3.2.1. Merhem.....	18
2.3.2.2. Krem	18
2.3.2.3. Pat.....	19
2.3.2.4. Köpük	19
2.3.2.5. Emülsiyon	19
2.3.2.6. Süspansiyon.....	20
2.3.2.7. Jel	21
2.3.2.7.1. Jellerdeki katkı maddeleri	22
2.4. Kitosan Jel.....	23
2.5. <i>Helichrysum</i> Geartner Cinsi	25
2.5.1. <i>Helichrysum pamphlicum</i> Davis & Kupicha	25
3. GEREÇLER.....	27
3.1. Kullanılan Maddeler	27
3.2. Kullanılan Cihazlar	28
4. YÖNTEM	29
4.1. Formülasyonların Hazırlanması	29
4.2. Formülasyonların Karakterizasyonu.....	32

4.2.1.	Formülasyonların fiziksel görünüşünün değerlendirilmesi	32
4.2.2.	Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi.....	32
4.2.3.	Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi	32
4.2.4.	<i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi için analitik validasyon çalışması	32
4.2.4.1.	Absorbans belirleme	32
4.2.4.2.	Doğrusallık	32
4.2.4.3.	Kesinlik	33
4.2.4.4.	Doğruluk.....	33
4.2.4.5.	Seçicilik	33
4.2.5.	Formülasyonlardaki <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi miktarının belirlenmesi.....	33
4.2.6.	<i>In vitro</i> dissolüsyon çalışması	33
4.2.7.	Salım kinetiği	34
4.3.	Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	34
4.3.1.	<i>In vitro</i> antioksidan aktivite çalışmaları.....	34
4.3.1.1.	Metal şelatlayıcı yöntem.....	34
4.3.1.2.	ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi	35
4.3.1.3.	Redükleyici güç ölçümü	35
4.3.1.4.	DPPH serbest radikal süpürücü yöntem	36
4.3.2.	HET-CAM (hen's egg test on the chorioallantoic membrane assay) yöntemi ile <i>in vivo</i> antiinflamatuvar etkinliğin belirlenmesi	36
4.3.2.1.	Pellet hazırlanışı.....	37
4.3.2.2.	HET-CAM Deneyinin Yapılışı	37
4.3.2.3.	HET-CAM Deneyinin sonuçlarının değerlendirilmesi..	38
5.	BULGULAR.....	40

5.1. Formülasyonların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	40
5.1.1. Formülasyonların fiziksel görünüşünün değerlendirilmesi	40
5.1.2. Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi.....	44
5.1.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi	46
5.1.3.1. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi (Ölçüm 1)	46
5.1.3.2. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi (Ölçüm 2)	49
5.1.3.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi (Ölçüm 3)	53
5.1.4. <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresinin analitik validasyon çalışması.....	56
5.1.4.1. Absorbans belirleme.....	56
5.1.4.2. Doğrusallık	56
5.1.4.3. Kesinlik	58
5.1.4.4. Doğruluk.....	60
5.1.5.5. Seçicilik	61
5.1.5. Formülasyonlardaki <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi miktarının belirlenmesi.....	64
5.1.6. <i>In vitro</i> dissolüsyon çalışması	65
5.1.7. Salım Kinetiği	68
5.2. Biyolojik aktivite çalışmaları sonuçları	91
5.2.1. <i>In vitro</i> antioksidan aktivite çalışmaları sonuçları.....	91
5.2.1.1. Metal şelatlayıcı yöntem sonuçları.....	91
5.2.1.2. ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi sonuçları	91
5.2.1.3. Redükleyici güç sonuçları	92
5.2.1.4. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem sonuçları	93

5.2.2. HET-CAM (hen's egg test on the chorioallantoic membrane assay) yöntemi ile <i>in vivo</i> antiinflamatuvar etkinliği sonuçları....	93
6. TARTIŞMA.....	104
6.1. Formülasyonların hazırlanması ve karakterizasyonu	104
6.1.1. Formülasyonların fiziksel görünüşünün değerlendirilmesi	105
6.1.2. Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi.....	105
6.1.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi	107
6.1.4. <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresinin analitik validasyon çalışması.....	108
6.1.5. Formülasyonlardaki <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi miktarının belirlenmesi.....	110
6.1.6. <i>In vitro</i> dissolüsyon çalışması	110
6.1.7. Salım Kinetiği	112
6.2. Biyolojik aktivite çalışmaları.....	113
6.2.1. <i>In vitro</i> antioksidan aktivite çalışmaları.....	113
6.2.2. HET-CAM yöntemi ile <i>in vivo</i> anti-inflamatuvar etkinlik çalışmaları	115
7. SONUÇ	117
KAYNAKÇA.....	118
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1. Hazırlanan formülasyonlarda kitosan oranları.....	29
Tablo 4.2. 10 gram jel için formülasyon içerikleri.....	31
Tablo 4.3. CAM üzerindeki antiinflatuvar etkinin değerlendirilmesinde kullanılan skor sistemi	39
Tablo 4.4. HET-CAM yönteminde değerlendirmede kullanılan inhibisyon skalası.....	39
Tablo 5.1. <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ve absorbans değerleri.....	57
Tablo 5.2. 25 µg.mL ⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları	58
Tablo 5.3. 35 µg.mL ⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları	59
Tablo 5.4. 45 µg.mL ⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları	60
Tablo 5.5. <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi için elde edilen doğruluk değerleri	61
Tablo 5.6. Miktar tayini sonuçları.....	64
Tablo 5.7. HP ve F9-HP kodlu formülasyona ait zamana karşı kümülatif çözünen HP miktarları.....	65
Tablo 5.8. F9-HP kodlu formülasyon için 6 saatlik salım kinetiği sonuçları	69
Tablo 5.9. HP, F9-HP ve F9 için metal şelatlayıcı yöntem aktivite sonuçları.....	91
Tablo 5.10. HP, F9-HP ve F9 için ABTS ^{•+} yöntemi aktivite sonuçları	92
Tablo 5.11. HP, F9-HP ve F9 için Redükleyici güç yöntemi aktivite sonuçları.....	92
Tablo 5.12. HP, F9-HP ve F9 için DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi	

aktivite sonuçları 93

Tablo 5.13. HP ve F9-HP kodlu formülasyonun in vivo antiinflamatuvar etki

sonuçları 94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kitosan yapısı.....	3
Şekil 2.2. Kitin veya kitosan hazırlama aşamalarında yer alan farklı adımların şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.3. Deriden geçiş yolları	13
Şekil 2.4. Topikal formülasyonların sınıflandırılması.....	14
Şekil 4.1. HET-CAM deneyinin yapılışı.	38
Şekil 5.1. Hazırlanan boş formülasyonların görüntüleri.....	40
Şekil 5.2. Hazırlanan boş formülasyonların üstten görüntüleri	41
Şekil 5.3. Hazırlanan HP içeren formülasyonların görüntüleri	42
Şekil 5.4. Hazırlanan HP içeren formülasyonların üstten görüntüleri.....	43
Şekil 5.5. Boş formülasyonlara ait pH değerleri	44
Şekil 5.6. HP içeren formülasyonlara ait pH değerleri.....	45
Şekil 5.7. pH ayarı yapılmış HP içeren formülasyonlara ait pH değerleri	45
Şekil 5.8. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için reogramı (viskozite)	46
Şekil 5.9. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için reogramı (tork)	47
Şekil 5.10. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için reogramı (hız).....	47
Şekil 5.11. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için Bingham Modele uygunluk grafiği.....	48
Şekil 5.12. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için Casson Modele uygunluk grafiği.....	48
Şekil 5.13. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için Power Law Modele	

uygunluk grafiği.....	49
Şekil 5.14. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için reogramı (viskozite)	50
Şekil 5.15. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için reogramı (tork)	50
Şekil 5.16. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için reogramı (hız).....	51
Şekil 5.17. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için Bingham Modele uygunluk grafiği.....	51
Şekil 5.18. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için Casson Modele uygunluk grafiği.....	52
Şekil 5.19. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için Power Law Modele uygunluk grafiği.....	52
Şekil 5.20. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için reogramı (viskozite)	53
Şekil 5.21. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için reogramı (tork)	53
Şekil 5.22. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için reogramı (hız).....	54
Şekil 5.23. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için Bingham Modele uygunluk grafiği.....	54
Şekil 5.24. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için Casson Modele uygunluk grafiği.....	55
Şekil 5.25. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için Power Law Modele uygunluk grafiği.....	55
Şekil 5.26. HP'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{max} = 308.0$ nm)	56
Şekil 5.27. Helichrysum pamphylicum metanol ekstresine ait standart eğri.....	57
Şekil 5.28. Helichrysum pamphylicum metanol ekstresine ait spektrum.....	62

Şekil 5.29. pH 5.5 PBS'e ait spektrum	62
Şekil 5.30. Helichrysum pampylicum metanol ekstresi içermeyen formülasyona (F9) ait spektrum.....	63
Şekil 5.31. F9-HP kodlu formülasyonun için miktar tayini sonuçları.....	64
Şekil 5.32. HP ve F9-HP kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği (48 saat)	66
Şekil 5.33. HP ve F9-HP kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği (9 saat)	67
Şekil 5.34. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik) .	72
Şekil 5.35. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, T_{lag}).....	72
Şekil 5.36. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, F_0).....	73
Şekil 5.37. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik) ...	73
Şekil 5.38. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, T_{lag}).....	74
Şekil 5.39. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max})	74
Şekil 5.40. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max} ve T_{lag}).....	75
Şekil 5.41. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Higuchi Modeli)	75
Şekil 5.42. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, T_{lag}).....	76
Şekil 5.43. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, F_0).....	76
Şekil 5.44. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli)	77

Şekil 5.45. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli, T_{lag}).....	77
Şekil 5.46. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas modeli, F_0).....	78
Şekil 5.47. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli)..	78
Şekil 5.48. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli, T_{lag}).....	79
Şekil 5.49. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli)	79
Şekil 5.50. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli, T_{lag}).....	80
Şekil 5.51. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli)..	80
Şekil 5.52. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli, T_{lag}).....	81
Şekil 5.53. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli)..	81
Şekil 5.54. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli, T_{lag}).....	82
Şekil 5.55. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli)..	82
Şekil 5.56. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli, T_{lag}).....	83
Şekil 5.57. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Quadratic model).....	83
Şekil 5.58. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Quadratic model, T_{lag})	84
Şekil 5.59. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 1 modeli).....	84

Şekil 5.60. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 2 modeli).....	85
Şekil 5.61. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 3 modeli).....	85
Şekil 5.62. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 4 modeli).....	86
Şekil 5.63. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Logistic 1 modeli)	86
Şekil 5.64. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Logistic 2 modeli)	87
Şekil 5.65. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Logistic 3 modeli)	87
Şekil 5.66. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 1 modeli)	88
Şekil 5.67. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 2 modeli)	88
Şekil 5.68. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 3 modeli)	89
Şekil 5.69. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 4 modeli)	89
Şekil 5.70. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Probit 1 modeli).....	90
Şekil 5.71. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Probit 2 modeli).....	90
Şekil 5.72. HP metanol ekstresinin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-1 ...	95
Şekil 5.73. HP metanol ekstresinin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-2 ...	96
Şekil 5.74. F9-HP kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-1.....	97
Şekil 5.75. F9-HP kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-2.....	98
Şekil 5.76. F9 kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-1	99
Şekil 5.77. F9 kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-2	100
Şekil 5.78. Hidrokortizon'un CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi.....	101
Şekil 5.79. SDS'nin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi	102
Şekil 5.80. Agaroz ile normal embriyo gelişimi (%2.5, a/h).....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS ^{•+}	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
AIC	: Akaike bilgi kriteri
BHT	: Bütil hidroksi toluen
CAM	: Koryoallantoik zar/membran
CoF	: Sürtünme katsayısı
cP	: Centipoise
D/cm ²	: Dyne/santimetre kare
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH-H	: İndirgenmiş DPPH
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FeCl ₂	: Demir (II) klorür
FeCl ₃	: Demir (III) klorür
HET-CAM	: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane Assay
HMW	: Yüksek moleküler ağırlıkta kitosan
HP	: <i>Helichrysum pamphylicum</i> metanol ekstresi
K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	: Potasyum ferrisiyanid
LMW	: Düşük moleküler ağırlıkta kitosan
MMW	: Orta moleküler ağırlıkta kitosan
MSC	: Model seçme kriteri
R ²	: Korelasyon katsayısı
RPM	: Dakikadaki devir sayısı
RSD	: Varyasyon katsayısı
Rsq _r	: Korelasyon katsayısı (r ²)

Rsqr_adj	: Düzeltilmiş korelasyon katsayısı (r^2_{adjusted})
SC	: <i>Stratum corneum</i>
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH	: Standart hata
SS	: Standart sapma
TCA	: Trikloroasetik asit
Vit C	: Askorbik asit

1. GİRİŞ

Kitosan, toksik ve immünöjenik olmayan doğasının sahip olduğu mükemmel biyobozunurluk, hızlandırılmış yara iyileştirme, antimikrobiyel etkinlik gibi özellikleri ile dikkat çeken polimerdir. Kitosanın biyouyumluluğu biyomedikal uygulamalar, implantasyonlar gibi farklı tıbbi uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Kitosan jelin inflamatuvar hücrelerin büyümesini yavaşlatma, fibroblast proliferasyonunu uyarma, makrofajları aktiveleştirme, daha düşük fibroplazi derecesi sağlama, yeniden epitelizasyonu teşvik etme, bağışıklık sistemini uyarma, hemostatik özellikleri ve antitümör etkinliğe sahip olması, onun antiinflamatuvar ve yara iyileştirici olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Türkiye florası için endemik bitki olan *Helichrysum pamphylicum*, diğer *Helichrysum* türleri gibi flavanoitler ve floroglusinol türevleri başta olmakla fenolik bileşikler açısından oldukça zengindir. Fenolik bileşiklerin, antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör ve antimikrobiyal etki gibi özellikleri dahil birçok fizyolojik etkileri bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında *Helichrysum pamphylicum* Davis et Kupicha türüne ait toprak üstü kısımlardan elde edilen metanol ekstresini içeren kitosan bazlı jel formülasyonu başarı ile hazırlanmış ve karakterize edilmiştir.

Antioksidan aktivite sonuçlarına göre F9-HP kodlu formülasyon belirgin bir şekilde DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} kasyon renksizleştirici ve metal şelatlayıcı antioksidan aktivite gösterirken zayıf redükleyici antioksidan potansiyel göstermiştir.

Kitosan jeli ve *H. Pamphylicum* metanol ekstresinin sinerjistik etki ile kuvvetli antiinflamatuvar etki gösterdiği HET-CAM yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada hem antioksidan hem de antiinflamatuvar tedavide kullanılacak *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi içeren kitosan bazlı jellerin başarılı bir şekilde formüle edilip karakterize edildiği söylenebilir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kitosan

Kitosan biyomedikal alanda en çok kullanılan polimerlerden biridir (Kumar vd., 2016). Kitinin N-deasetilasyonu ile sonuçlanan konsantre sodyum hidroksit solüsyonu ile işlenmesi yoluyla üretilir (Abd El-Hack vd., 2020). Kitin kabukluların ve böceklerin dış iskeletinin yapısal malzemesi olup, tabiatta selülozdan sonra en bol yayılmış doğal polimerdir (Ogawa vd., 2004). Kitinin doğadaki kaynağı deniz kabuklularının kabukları, böceklerin ve yumuşakçaların iskeletleri ve kitin içeriği %10-20 olan mantar türleridir. Sadece dünya okyanusunda doğal olarak yıllık kitin üretimi miktarı yaklaşık olarak 2-3 milyar tona ulaşmaktadır. Kitosan doğada zor bulunan polimerdir, bu yüzden kitinden kimyasal ve biyolojik yöntemlerle hazırlanmaktadır (Demina vd., 2014).

Kitosan toksik olmaması, biyoyumluluğu ve biyoboşuurluğu gibi kendine has özelliklerinden dolayı çeşitli uygulamalar için oldukça çekici bir maddedir (Şenel ve McClure, 2004). Kitosan koyulaştırıcı, topaklaştırıcı, artııcı, film oluşturucu, gaz seçici membran, afinite kromatografisi kolon matrisi, bitkilerde hastalıklara karşı direnç arttırıcı, antikanser, yara iyileştirici, antimikrobiyal vs. özelliklere sahiptir. Evcil hayvan mamaları, yara pansumanları, yapay organ hazırlanmasında, kozmetik ve farmasötik alanda kullanılmaktadır (Shepherd vd., 1997).

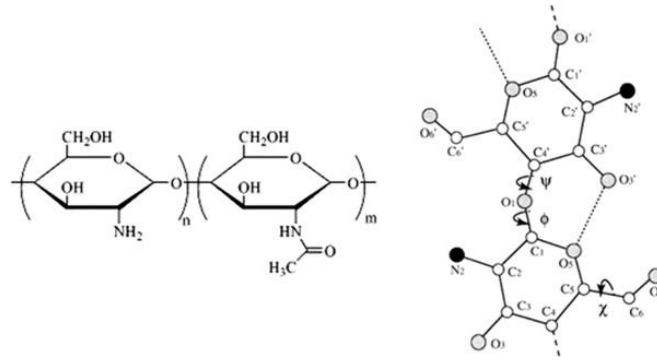
In situ jelleşme, hidrofillik yapı, mukoadesyon ve geçirgenlik arttırma gibi önemli özelliklerinden dolayı birçok ilaç salım sistemi geliştirilmesini kolaylaştıran bir polimer olan kitosan farmasötik alanda ilaç salım sistemi olarak kullanılmaktadır (Muxika vd., 2017).

2.1.1. Kitosanın yapısı

Kitosanın molekülü, asetillenmiş kısımların derecesine bağlı olmakla farklı derecelerde mevcut olan N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin birimlerinin oluşturduğu kopolimerdir. Tekrarlanan glukozamin kalıntısında bir amino ve iki hidroksil grubuna sahip polikasyonik polimerdir. Karbonhidrat zinciri, selüloza benzer olup, C2 pozisyonunda hidroksil grubunun yerini asetamino grubunun alması dışında, farklı derecelerde N-asetilasyona sahip β -1,4-bağlı D-glukozaminden oluşmuş selüloza çok benzemektedir. Bundan dolayı kitosan, iki tip tekrarlanan (1 \rightarrow 4) β -glikosidik bağlarla birbirine bağlanmış N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-D-

glukopiranozdan oluşmuş bir kopolimerdir. Rafine işleminden sonra kitosan, molekül dahili ve moleküller arası hidrojen bağlarından dolayı sert kristal yapı sergilemektedir. Reaktif molekül üzerinde bulunan birincil amino grupları, çeşitli yan grupların bağlanabilmesini sağlar. Moleküle eklenen yan gruplar, polimerin fiziksel veya biyolojik özelliklerini değiştirir (Dash vd., 2011).

Şekil 2.1.'de kitosanın yapısı sunulmuştur.



Şekil 2.1. Kitosan yapısı

Bireysel atomlar numaralandırılmıştır. Kesikli çizgiler O3–O5 hidrojen bağlarını gösterir. Ana zincir konformasyonunu tanımlayan iki dihedral açı (ϕ , ψ) ve O6 oryantasyonunu tanımlayan bir dihedral açı χ belirtilmiştir (Dash vd., 2011).

2.1.2. Kitosanın fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri

Selüloz, dekstran, nişasta, aljinik asit, pektin, agar-agar, karagen gibi doğal polimerler asidik veya nötr iken kitosan doğada bulunan tek alkali polisakkarittir. Kokusuzdur, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir, toksik değildir (Bakshi vd., 2020). Biyolojik olarak parçalanabilir kabul edilmesi kitosanın, lizozim başta olmakla bazı insan enzimleri tarafından metabolize edilebilir olmasından kaynaklıdır. Kitosanın pozitif yüklü olması oldukça önemlidir. Bu özellik kitosanın sulu ortamda temas halinde olan negatif yüklü polimerler, polianyonlar ve moleküllerle etkileşime girmesini sağlamaktadır (Prabaharan, 2008).

Kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri, onun moleküler ağırlığı, deasetilasyon derecesi, kristallik derecesi gibi özelliklerine bağlıdır. Kitosanda bir amino veya asetamino grubuna ek olarak, C-2, C-3 ve C-6 konumlarında aynı zamanda hem birincil

hem de ikincil hidroksil gruplarında üç türde reaktif fonksiyonel grup bulunmaktadır. Amino grubu, intra-moleküler hidrojen bağları sayesinde fizikokimyasal ve yapısal özelliklerde bulunan farklılıklardan sorumludur (Bakshi vd., 2020).

Hazırlanmış nihai kitosan ürününün performansı ve fiziksel özellikleri, işlem boyunca kullanılan sıcaklık, işlem süresi, reaktiflerin tür ve konsantrasyonu gibi farklı koşullardan etkilenebilir. Ancak hem molekül ağırlığı hem de deasetilasyon derecesi daha fazla değiştirilebilir. Örnek olarak, molekül ağırlığı enzimatik veya asidik depolimerizasyon ile, deasetilasyon derecesi ise yeniden asetilasyonla düşürülebilir (Bakshi vd., 2020).

2.1.2.1. Molekül ağırlığı

Kitosan, moleküler ağırlığını tanımlamakta olan polimer molekülü başına düşen şeker birimi sayısı ile karakterize edilen bir glukozaminoglukandır. Çözünürlük, viskozite, elastiklik, biyofonksiyonel aktiviteleri içeren fizikokimyasal özellikler, katılar üzerinde absorpsiyon, yırtılma mukavemeti gibi özellikler kitosanın moleküler ağırlığına bağlıdır. Kitosanın moleküler ağırlığı, morfolojik karakterini ve kristal yapısını etkiler. Kitosanın artan moleküler ağırlığı ile kristalliğinin azaldığı bilinmektedir. Deasetilasyon işlemi moleküler ağırlığında değişiklik meydana getirmektedir. Hazırlanma prosedürü ve kaynağa bağlı olarak kitosanın moleküler ağırlığı 50 ila 2000 kDa arasında değişmektedir (Bakshi vd., 2020). Düşük moleküler ağırlıklı kitosan, genellikle yüksek moleküler ağırlıklı kitosana göre daha önemli biyoaktiviteler göstermektedir (Kou vd., 2021). Moleküler ağırlık bağlamında karşılaşılan en büyük zorluklar, örneklerin çözünürlüğü ve polisakkarit çözeltilerinde sıklıkla bulunan agregatların oluşmasıyla ilgilidir (Rinaudo, 2006). Kitosanın suda çözünürlüğü ve moleküler ağırlığı arasındaki korelasyon, biyolojik aktiviteler ve moleküler ağırlığı arasında ilişkiye göre karşılaştırılabilir bir eğilim göstermektedir. Moleküler ağırlık ne kadar düşük olursa, karbonhidrat molekülünün çözünürlüğü de o kadar yüksek olur. Düşük moleküler ağırlığa sahip kitosan suda serbest amin formunda çözünürken, yüksek moleküler ağırlığa sahip kitosana suda çözündürmek için amino grubunun asitle protonasyonu gerekmektedir. Laktik asit, hidroklorik asit (HCl), pirüvik asit ve sitrik asit gibi fosforik asit dışında insan vücudunda bulunan birçok asit kitosana suda çözümlenebilir de, bu amaç için kullanılacak en uygun asit asetik asittir (Kou vd., 2021).

Birçok diğer polimer gibi kitosanın da moleküler özellikleri polidispersdir. Bu özellikle moleküler ağırlık içinde geçerlidir. Kitosanın moleküler ağırlığı, deasetilasyon

süreci boyunca oluşan depolimerizasyonun sonucudur. Moleküler ağırlığı heterojen dağılımını tanımlamak için ortalama molekül ağırlığı ifadesi kullanılır. Ortalama molekül ağırlığı farklı şekillerde belirlenip, gösterilebilmektedir. Bunlara, ozmometre ile belirlenen sayıca ortalama molekül ağırlık (M_n), viskozimetre ile belirlenen viskozite ortalama molekül ağırlık (M_v), ışık saçılımı yöntemiyle belirlenen ağırlıkça ortalama molekül ağırlık (M_w) ve sedimentasyonla belirlenen ortalama molekül ağırlık (M_z) gösterilebilir. Tipik bir dağılım eğrisi olan Schutlz-Flory dağılımına göre ortalama değerlerin birbiriyle ilişkisi $M_n: M_w: M_z$ için 1: 2: 3 oranında olup, $M_n < M_v < M_w < M_z$ şeklindedir. Polidispersite indeksi (PDI), M_w/M_n olarak tanımlanır, dağılımın ne kadar geniş olduğunu göstermektedir (Lizardi-Mendoza vd., 2016).

Kitosanın ortalama molekül ağırlığını bulmak için çeşitli analitik yöntemler mevcuttur. Bir polimerin yapısı, boyutu ve davranışı hakkında en doğru bilginin seyreltik çözeltilerden elde edildiği kabul edilmiştir. Seyreltik çözeltilerde kitosanın ortalama molekül ağırlığını bulmak için dinamik ışık saçılımı ve viskozimetri gibi teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosanın özelliklerini iyileştirmek veya kontrol etmek amacıyla kitosanın molekül ağırlığını değiştirmek ve modifiye etmek için çeşitli yöntemler hazırlanmıştır. Genel olarak, kitosanın molekül ağırlığı kimyasal, fiziksel veya enzimatik hidroliz ile azaltılabilir. Kimyasal yöntemlerle kitosanı hidroliz etmek için asidik, alkali ve oksidatif reaksiyonlar kullanılmaktadır. Fiziksel yöntemler, glikozidik bağı kırmak amacıyla gerekli olan enerjiyi sağlar. Bu zaman kitosanı depolimerize etmek için sonik, termal, hidromekanik ve ışınlama yöntemleri etkin olarak kullanılır. Alternatif olarak, kitinazlar ve diğer hidrolitik enzimler düşük molekül ağırlıklı kitosan ve oligomerlerini hazırlamak için kullanılmaktadır (Lizardi-Mendoza vd., 2016).

2.1.2.2. Deasetilasyon derecesi

Kitosanın biyolojik olarak parçalanabilir olması, reaktivitesi, çözünürlüğü ve birçok substratın absorpsiyonu, polimerik zincirde bulunan protonlanmış amino gruplarının miktarına, yani asetillenmemiş ve asetillenmiş glukozamin birimlerinin oranına bağlıdır (de Alvarenga vd., 2010). Kitosanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde deasetilasyon derecesinin büyük payı vardır (Lavertu vd., 2003). Kitosan kitosanazlar, kitinazlar ve birçok çeşitli enzimler tarafından parçalanabilir. Çalışmalar, lizozimlerin kitosan içeren asetil gruplarını seçici olarak hedeflediğini

göstermiş, bu nedenle, yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan polimerleri, düşük deasetilasyon derecesine sahip kitosan polimerlerine göre daha yavaş bozunma hızına sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Moran vd., 2018). Ek olarak deasetilasyon derecesi, kitin ve kitosanı birbirinden ayırmak için polisakkaritlerin serbest amino gruplarının içeriğini belirlemesinden dolayı kullanılabilir. Örnek olarak, %75 ve üzeri deasetilasyon derecesine sahip olan kitinin kitosan olduğu bilinir. Deasetilasyon işlemi, asetil gruplarının kitinin molekül zincirinden çıkarılması ve geride tam bir amino grubu bırakmasını içerir. Deasetilasyon derecesini ayarlamak için birkaç yöntem mevcuttur. Bunlardan biri, sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin güç veya sıcaklığı artırıldığında asetil gruplarının kitinden çıkarılması da artırılabilir, bu da birçok farklı özellikte kitosan molekülünün ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Kitosanın deasetilasyon derecesi genel olarak reaksiyon koşulları ve saflaştırma yöntemine bağlı olduğu için, ilaç salım sistemlerinin hazırlanması aşamasında kullanılmadan önce belirlenerek karakterizasyonu yapılmalıdır (Ahmad Khan vd., 2002).

Deasetilasyon derecesinin belirlenmesi için UV-Vis spektroskopi, IR spektroskopisi, pH-metrik titrasyon, element analizi gibi basit yöntemler ve H-NMR spektroskopisi, C-NMR spektroskopisi gibi kompleks yöntemler kullanılmaktadır (Czechowska-Biskup vd., 2012). Bunlardan IR spektroskopisi deasetilasyon derecesi ölçümü için en fazla kullanılan tekniktir. IR spektroskopisi, oldukça hızlı yöntemdir ve KBr disk tekniği ile çözünmeyen kitosanla birlikte kullanılabilir. Diğer yöntemlerin sonuçları genellikle IR yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılır (Lavertu vd., 2003).

NMR esaslı ölçümlerden başka diğer tüm ölçüm teknikleri, kitosanın önceden doğru bir şekilde tartılmasını gerektirmektedir. Bu sebeple numunenin saflığı ayrı olarak belirlenmeli ve nem dikkatlice giderilmelidir. Ek olarak NMR olmayan yöntemler birçoğu yanlış, uzun ve karmaşık uygulamalıdır. H-NMR yönteminde ise, kullanılacak kitosanın kesin miktarını bilmek önemli değildir ve numunenin hazırlanması basittir. Birkaç milligram kitosan numune hazırlamak için yeterlidir ve deasetilasyon derecesi bilinen referans numunesi veya herhangi bir kalibrasyon eğrisi gerekli değildir (Lavertu vd., 2003).

2.1.2.3. Viskozite

Deasetilasyon ve konsantrasyon derecesi ile kitosan çözeltilisinin viskozitesi artar, sıcaklık ile azalır. Kitosanın ticari bakımdan temin edilebilen geniş viskozite aralığı vardır. Moleküler ağırlığının yüksek olması ve lineer, dallanmamış yapıya sahip olması sayesinde viskozite arttırıcı ajan olarak kullanılır. Viskozitesinin artan kayma hızıyla azalmasından dolayı kitosan psödoplastiktir (Bakshi vd., 2020).

2.1.2.4. Çözünürlük

Molekülünde bulunan serbest amino gruplarının protonlanmasından dolayı kitosan, pH 6.2'nin altında asetik asit ve formik asit gibi organik asitlerin sulu çözeltilerinde çözülebilmektedir. Genel olarak, kitosan çözeltilerinin özellikleri, pH, deasetilasyon derecesi, konsantrasyon, asit konsantrasyonu, iyonik kuvvet, sıcaklık, molekül zincirinde asetil gruplarının dağılımı ve asit türü gibi birçok parametrelere bağlıdır (Elhefian, 2010).

2.1.3. Kitosan üretimi için kaynaklar

Kitin ve kitosanın en önemli kaynakları, eklembacaklılar, annelidler (segmentli kurtlar), yumuşakçalar, algler gibi omurgasızların dış iskeleti ve mantarlardır. Her yıl çok fazla yumuşakça ve kabuklu dış iskeleti ve kabukları, atık olarak işleme tesislerinde atılmaktadır (Alishahi vd., 2011). Üretilmiş atıklar, kalsiyum karbonat ile ortalama olarak %40 kitin içermektedir. Atıklarda bulunan bu kitin miktarı, kitin ve türevlerinden hazırlanan ürünler için oldukça umut verici kaynaklardır. Kabuklulardan kitinin ekstraksiyonu için protein, pigment ve minerallerin çıkarılması gereklidir (Ni'mah vd., 2019). Kitosanın ekstraksiyonu üç yöntemle yapılabilir ve bunlar biyolojik ekstraksiyon, enzimatik hidroliz, kimyasal süreç olarak sınıflandırılmaktadır (Alishahi vd., 2011).

2.1.4. Kitosanın hazırlanma yöntemleri

Özel olarak karotinoedlerin geri kazanımını içeren kitosanın gıda atığı olarak elde edilmiş kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarından üretilmesi, ekonomik olarak uygun maliyetlidir. Bu kabuklar karotenoid olan, balık yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılan önemli miktarda aksantin içermektedir. Kitosan kendisi, asit ve alkali muamelesi ile doğrudan mantarlardan üretilebilir (Abdou vd., 2008).

2.1.4.1. Kuru kitlenin işlenmesi

Kabukluların dış iskeleti genel olarak birkaç millimetreye kadar uygun boyuta öğütülür ve organik maddelerden arındırılmak için bol miktarda su ile yıkanır. Daha önce

yapılan bir çalışmada atıkların 24 saat boyunca kaynar su ile ön arıtılmasını ve sonrasında 24 boyunca 80°C'de kurutulması uygulanmıştır (Peniche Covas vd., 2008).

2.1.4.2. Deasetilasyon

Kitinin güçlü bir alkali çözelti ile alkalın deasetilasyonu kitosan üretmek için ana prosedürdür. Kitinin farklı kaynaklardan izolasyonu kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Genellikle ilk olarak hammadde ezilir, sonrasında su veya deterjanla yıkanarak küçük parçalar haline getirilir. İşlemler farklı kabukluların dış iskeletinin mineral içeriğinin de farklı olmasında dolayı değişiklik göstermektedir (Abdou vd., 2008).

2.1.4.3. Deproteinizasyon

Proteinleri arındırmak amacıyla en çok kullanılan yöntem, kabukların %1-10 sulu sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile 65-100°C sıcaklıklarda işlenmesidir. Uygulamaya bağlı olarak reaksiyon süresi genel olarak 0.5 ile 72 saat arasında değişmektedir. Çok yüksek sıcaklıklar ve uzun süreli işlemler, kısmi deasetilasyona ve polimer zincirlerinin kırılmasına neden olabilmektedir. Bazı durumlarda 1-2 saatlik işlem süresi yeterli olmaktadır. Proteinleri arındırmak için kullanılan reaktiflere örnek olarak potasyum hidroksit (KOH), kalsiyum oksit (Ca(OH)_2), sodyum karbonat (Na_2CO_3), potasyum karbonat (K_2CO_3), sodyum bikarbonat (NaHCO_3), sodyum bisülfid (NaHSO_3), sodyum sülfid (Na_2SO_3), sodyum sülfür (Na_2S) ve trisodyum fosfat (Na_3PO_4) gösterilebilir (Peniche Covas vd., 2008).

Kitinin kimyasal bozunmasını en aza indirdiği ve çevresel bakımdan daha temiz işlemlerle yapıldığından dolayı izole edilmiş enzimler ve biyolojik fermentasyon kullanılarak yapılmakta olan deproteinizasyon başarı ile uygulanmaktadır. Bununla birlikte, üretilen son malzemede %1-7 oranında protein kalıntısı bulunması ve zaman alıcı bir işlem olması gibi dezavantajlara sahiptir. Kitin üretim maliyetini düşürmek için protein geri kazanılabilir. Geri kazanılan protein hayvan yemleri için önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Peniche Covas vd., 2008).

2.1.4.4. Demineralizasyon

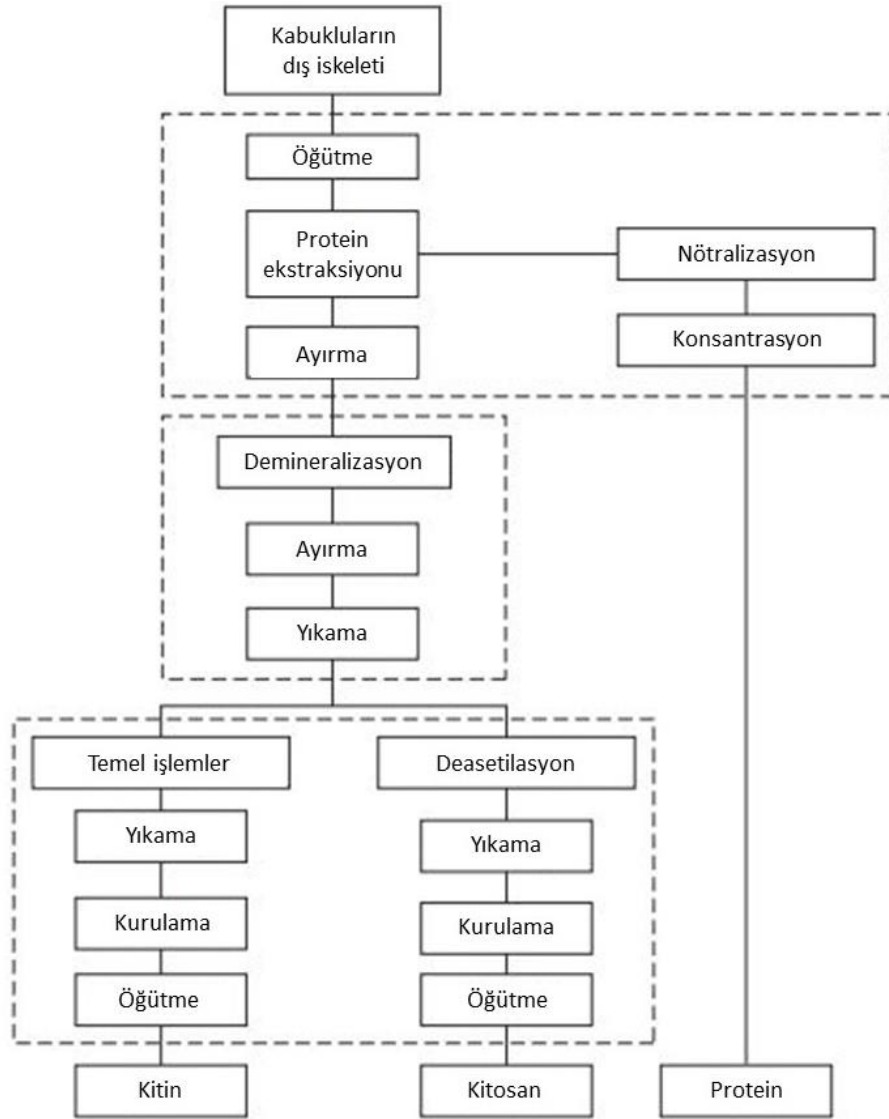
Kabukluların dış iskeletinin ana inorganik bileşeni, genel olarak seyreltik HCl çözeltisi ile oda sıcaklığında elimine edilen kalsiyum karbonattır (CaCO_3). Ek olarak, Sülfürik asit (H_2SO_4), nitrik asit (HNO_3), formik asit (HCOOH) ve asetik asit

(CH₃COOH) gibi asitler de bu amaçla kullanılabilir. Demineralizasyon işlemi aşağıdaki reaksiyonla gerçekleştirilmektedir:



Demineralizasyon işlemi, kullanılan asitin miktarının stokiyometrik oranın altında olması durumunda tamamlanmaz. Reaksiyonun süresi ve asit konsantrasyonu kaynağa bağlıdır. Kitinin hidrolitik depolimerizasyonu ve deasetilasyonunu minimuma düşürmek için bu parametreler oldukça dikkatli şekilde kontrol edilmelidir. İşlem sırasında yüksek sıcaklık değerlerinden termal bozunmayı önlemek için kaçınılmalıdır (Peniche Covas vd., 2008).

Temel olarak kitosan üretimi şematik olarak Şekil 2.2’de sunulmuştur.



Şekil 2.2. Kitin veya kitosan hazırlama aşamalarında yer alan farklı adımların şematik gösterimi. Bu şemada, herhangi bir kalıntı proteini uzaklaştırmak için kitin izolasyonu için seyreltik NaOH ile ikinci bir uygulama düşünülmüştür (Peniche Covas vd., 2008).

2.2. Deri ve Anatomisi

2.2.1. Derinin Yapısı

İnsan bedeninin en büyük ve ağır organı olan deri, yetişkin bir insan için 1.5-2 m² alana, 3.5-10 kg ağırlığa sahiptir (Heuke vd., 2013). Deri yüzeyinin pH'si 5.6 civarında olup, sıcaklığı çekirdek vücut sıcaklığından biraz daha soğuktur. Terminal farklılaşmadan dolayı pul pul dökülmektedir (Cundell, 2018). Deri, birçok faydalı mikroorganizma türleri tarafından kolonize edilir, fiziksel bariyer görevi icra ederek cildi patojen

mikroorganizmaların istilasından korur. Bu bariyerin hasar alması veya mikrobiyolojik dengenin patojenlerden yana değişmesi durumlarında cilt hastalıkları, bazen ise sistemik hastalıklar ortaya çıkar. Bariyer işlevine ek olarak, pigmentleri sayesinde UV radyasyonuna karşı eşsiz bir koruma sağlayarak epidermiste bu ışıklardan kaynaklanan DNA hasarını azaltır (Costin ve Hearing, 2007).

İlaç alımı için deri, etkin maddenin sürekli olarak kan dolaşım sistemine verilmesine olanak sağlaması ve hastalar için rahat kullanımı nedeniyle avantajlı bir yoldur. Bunun yanı sıra, oral ve parenteral uygulama yollarına alternatif olarak, bunların farklı yan etkilerinden kaçınmaya olanak sağlar. Ek olarak, kullanılabilir yüzey alanının genişliği, enzimatik bozunmanın nisbeten düşük olması ve transdermal salım yoluyla ulaşılabilen uzun süreli uygulama gibi birçok üstünlüklerine rağmen, büyük bir bariyer görevi yerine getiren *stratum corneum*, transdermal ilaç uygulanmasını zorlaştıran faktör olarak ortaya çıkmaktadır (Bolzinger vd., 2012).

Cilt üzerinde bir madde kaydırıldığı zaman, cilt ve maddenin ara yüzeyinde etkisini gösteren sürtünme kuvveti birçok faktörden etkilenir ve aynı zamanda yapışma ve deformasyon fenomenleri tarafından yönetilir. Temas bölgesinde var olan Van der Waals etkileşimleri gibi kuvvetler nedeniyle atomlar arasında bağlantıların kurulması ve bu bağlantıların kırılması sonucu ortaya çıkan ara yüzey direnci yapışma bileşeni ile temsil edilir. Derinin dış yüzeyinde doğal olarak üretilmekte olan kalıcı ince bir lipid filmin var olması, temas alanı ve stres dağılımını değişebilir ve ayrıca yapışma kuvvetleri için oldukça büyük önem taşımaktadır (Kwiatkowska vd., 2009).

İlaç etkin maddelerinin deriden geçişi dermal / perkütan absorpsiyon terimi ile tanımlanır. Bu işlem penetrasyon, permeasyon (nüfuz etme) ve emilim olmakla üç aşamaya ayrılmıştır. Bir bileşenin cilt tabakasına girmesi penetrasyon, bir tabakadan diğerine nüfuz etmesi permeasyon, vasküler sisteme alımı ise emilim olarak adlandırılmaktadır (Bolzinger vd., 2012).

Deri, mekanik özelliklerine göre farklılık gösteren üç tabakadan (dıştan içe doğru; epidermis, dermis ve hipodermis) oluşmaktadır. Derinin en dış tabakası *stratum corneum* olarak tanımlanır (Kwiatkowska vd., 2009).

2.2.1.1. Epidermis

Epidermis, ~5-100 µm, avucun içi ve tabanlarda ise 600 µm'e kadar ulaşabilen kalınlığa sahip çok katmanlı epiteldir. Epidermiste kan ve sinir kaynakları

bulunmamaktadır (Costin ve Hearing, 2007). Bu tabaka genellikle keratinositler tarafından doldurulmuştur (Mikesh vd., 2013). Epidermin kendisi de birkaç katmana ayrılır. Bu katmanlar dıştan içe doğru sırasıyla *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* ve *stratum germinativum*'dur. *Stratum germinativum* genel olarak bazal tabaka adlandırılır (Eckert vd., 2005).

2.2.1.1.1. *Stratum corneum*

Stratum corneum yaklaşık ~15 µm kalınlığındadır ve heterojen bir yapıya sahiptir. Bu tabaka büyük ölçüde bariyer işlevi görür (Watkinson vd., 2013). *Stratum corneum*, protein esaslı, özel lipidlerin (harç) devamlı matrisi içerisinde terminal olarak farklılaşmış keratinositler veya korneositlerin (tuğla) gömülü olduğu tuğla duvara benzetilmiştir. Bu lipidler su bariyerinin esas unsurunu temin eder, fiziksel ve kimyasal hasarlanmalar ile devamlı aşınmaya karşı korunma korneositler tarafından sağlanır (Harding, 2004).

2.2.1.2. *Dermis*

Dermis, cildin büyük bir kısmını oluşturur ve yaklaşık ~1 mm kalınlığındadır. Elastin ve kollajen benzeri yapısal proteinlerin hücre dışı matrisinde bulunan fibroblastlardan oluşur. Dermis, dermal dendritik hücreler ve makrofajlar ile birlikte bir takım bağışıklık hücreleri içermektedir. Ek olarak yağ ve ter bezleri, duyu sinir uçları, kıl folikülleri, lenf ve kılcal damarlar burada bulunmaktadır (Ng ve Lau, 2015). Dermal tabaka, *papiller dermis* ve *retiküler dermis* olmakla iki kısımdan oluşmuştur. Bu tabakanın üst katmanında ince kolajen liflerinden oluşmuş *papiller dermis*, alt katmanında ise daha kalın ve yoğun kolajen liflerinden oluşmuş *retiküler dermis* yerleşmiştir (Mikesh vd., 2013).

2.2.1.3. *Hipodermis*

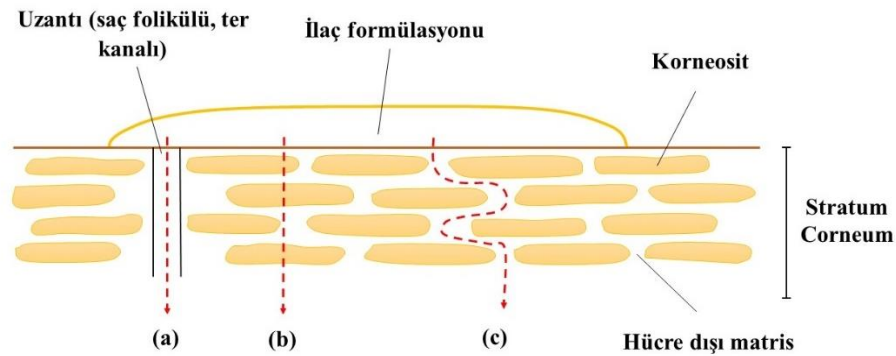
Cildin en alt tabakası hipodermistir. Göz kapağı gibi cildin bazı yağsız kısımlarında bu tabaka bulunmamaktadır. Genellikle derinin altında bulunan yağ tabakasından oluşmuştur. Derinin bu tabakasındaki daha büyük kan ve lenfatik damarlar gömülüdür (Ng ve Lau, 2015).

2.2.2. Deriden ilaç geçiş yolları

İlaç etkin maddelerinin deriden geçmesi, sağlıklı epidermis ve ter bezleri ile saç kökleri gibi deri eklerinden difüzyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Bu deri ekleri, toplam

insan derisinin sadece %0.1'i kadar alanı kaplar. Deriden ilaç etkin maddesinin geçmesi yalnızca *stratum corneum* ile sınırlıdır. Sağlam bariyerden iki yolla geçiş gösterilebilir: bunlardan birincisi korneositlerin arasında bulunan hücreler arası lipit yolu, ikincisi ise korneositlerle araya girmiş lipidlerin arasından geçen transsellüler yoldur (Moser vd., 2001).

Deriden ilaç geçişi şematik olarak Şekil 2.3.'te sunulmuştur.



Şekil 2.3. Deriden geçiş yolları (*stratum corneum* gösterilmiştir): (a) Yan geçit / apendageal yol, (b) Hücre içi / transsellüler yol ve (c) hücrelerarası / dolambaçlı ekstrasellüler yol (Ng ve Lau, 2015).

2.3. Topikal uygulama

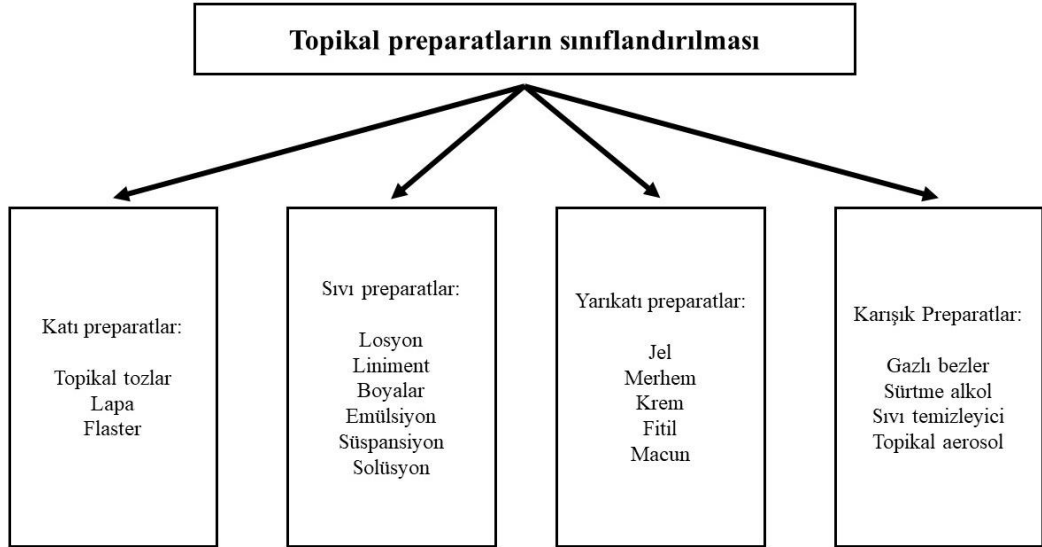
Topikal ilaç uygulaması, vücudun belirli bir yerinde (deriden, oftalmik, vajinal, rektal vs.) lokalize ilaç salım şeklidir. Deri, topikal uygulamanın ana yoludur ve topikal ilaç salımı için en kolay erişilebilir organlardandır (38). Topikal uygulama, kontrollü ve sürekli ilaç salımı potansiyeli taşımaktadır. İnvaziv olmayan, enfeksiyon kapma riskinin bulunmadığı bir ilaç salım şeklidir (Suman vd., 2020).

Deri hastalıklarının tedavisinde topikal ilaç uygulanması aktif farmasötik bileşenlerin kullanımında ortaya çıkabilecek sistemik yan etkilerinin oral ve parenteral ilaç uygulama yollarıyla kıyaslandığında oldukça azalmasından dolayı dikkat çekicidir (Schäfer-Korting vd., 2007). Buna ek olarak karaciğer metabolizmasından kaçınma, sabit bir plazma seviyesinin sağlanması gibi birçok sayıda avantajları nedeniyle de oral yolla uygulamaya cezbedici alternatif olarak öne çıkmaktadır (Bachhav ve Patravale, 2010).

Topikal taşıyıcı sistemler iki temel preparat türünü içerir. Bunlar aşağıda listelenmiştir.

1. *Harici topikal ürünler* – uygulandığı bölgeyi kaplamak için cilt üzerinde yayılan, dağıtılan veya püskürtülen ürünler;
2. *Dahili topikal ürünler* – mukoza zarına oral, nazal, vajinal uygulanan ürünler (Salunkhe ve Bhatia, 2013)

Topikal dozaj formları; sıvı, yarı katı ve katı olmakla birlikte üç ana kategoriye ayrılırlar (Garg vd., 2014). Topikal preparatların sınıflandırılması onların formülasyonlarına göre yapılmaktadır. Topikal formülasyonların sınıflandırılması şematik olarak Şekil 2.4.'te sunulmuştur.



Şekil 2.4. Topikal formülasyonların sınıflandırılması (Suman vd., 2020).

İlaçların topikal absorpsiyonuna etki gösteren faktörler fizyolojik ve fizikokimyasal faktörler olarak ikiye ayrılır. Bunları aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür.

Fizyolojik Faktörler:

- Derinin kalınlığı
- Cilt nemlenmesi
- Cilt pH'sı
- Cildin tipi

- Ter bezleri yoğunluğu
- Saç köklerinin yoğunluğu
- Deri iltihabı
- Kan akışı
- Lipid içerikleri

Fizikokimyasal faktörler:

- İyonizasyon derecesi
- Bölüm katsayısı
- Moleküler ağırlık (<500 Dalton)
- Taşıtların etkisi (Suman vd., 2020).

Topikal uygulanan ilaçlar genel olarak antiseptik, antifungal, cilt koruyucu ve yumuşatıcı olarak kullanılırlar. Topikal preparatların aktivitesi, ilacın cilde temas süresi, çözünürlüğü, lipofilitesi, geçirgenliği gibi birçok çeşitli faktöre bağlı olarak değişir. Topikal preparatların toksisitesi ve etkinliği, bir üründen ilaç etkin maddelerinin ve diğer kimyasalların deriden emilmesi, ürünün uygulandığı kişinin cilt fizyolojisi, tüketici pazarında ve hastalarda ürün algısı, kullanım zamanı uygulama koşulları gibi faktörlerden etkilenir (Roberts vd., 2021).

Topikal formülasyonların dezavantajları aşağıda sıralanmıştır:

1. Bazı topikal preparatlar aşırı hassaslık veya kontakt dermatit enfeksiyonları doğurabilir;
2. Yaranın iyileşme sürecine engel olabilir;
3. Deri florasında değişikliğe sebep olabilir;
4. Tam olarak doğru dozun verilmesi zordur;
5. Sıklıkla tekrar uygulamalar gerekebilir;
6. Bazı hastalar için uygulamada zorluklar çıkabilir veya estetik bakımdan kabul edilemez olması mümkündür;
7. Çok dozlu taşıyıcının devamlı kullanılması sonucu kontaminasyon olabilir (Lipsky ve Hoey, 2009).

Başarılı bir topikal formülasyonun karşılaması gereken özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Yeterli süre raf ömrüne sahip olmalı, bu süre boyunca fiziksel ve kimyasal kararlılığını korumalıdır;
2. Formülasyondan ilacın salınımını ve onun deriden geçişini temin etmeli;
3. Hastalar için kozmetik bakımdan zarif ve kabul edilebilir olmalı;
4. Yalnızca kabul edilebilir, FDA tarafından onaylanmış yardımcı maddeleri içermelidir;
5. Arzu edilen ambalajla uyumlu olmalı, kolay uygulanabilmeli;
6. Üretimi uygun maliyetli olmalıdır_(Tadwee vd., 2011).

Topikal ilaçların konsantrasyonunda zamana bağlı olarak aşağıdakiler dahil birçok faktörün etkisiyle değişiklikler olabilir:

- Topikal formülasyonun yapısında değişiklik;
- Zamana bağlı olarak cilt bariyerinin bütünlüğünün değişmesi;
- Cilt bariyerinde bölgesel değişkenliklerin oluşması;
- Hastalığın şiddeti;
- Alt tabakadaki dokuların gecikmiş veya artmış perkütan absorpsiyonla sonuçlanan topikal uygulanmış preparatlara tepkisi;
- Aktif bileşenlerin etkileri (Weiss, 2011).

2.3.1. Topikal dozaj formlarının yardımcı maddeleri

Dozaj formlarının yapılandırılması aşamasında aktif olmayan yardımcı bileşenler kullanılmaktadır. Bunlar, dozaj formlarının ilaç dışı bileşenleri olup, farmasötik eksipiyenler veya yardımcı maddeler olarak adlandırılır. Bu maddelerin terapötik değerleri genellikle hiç yoktur veya oldukça azdır. İdeal katkı maddelerinden beklenen özellikler toksik olmaması, ticari bakımdan uygun maliyetli ve kabul edilebilir kalitede olması, fiziksel ve kimyasal bakımdan kararlı olması, tedaviye uyumlu olmasıdır. Topikal preparatlardaki katkı maddelerinin ana kullanım amacı, absorpsiyon derecesinin kontrol edilmesi, dozaj formunun stabilite ve vizkozitesini koruması, formülasyona hacim vermesi, organoleptik özelliklerin iyileştirilmesidir. Yardımcı maddelerin sınıflandırılması çözücünün doğasına, seyrelticilere, taşıyıcı sistemlere, baza ve hastalar tarafından kabul edilebilir olmasına göre yapılmaktadır (Garg vd., 2014).

Topikal ürünlerden etkin madde salım oranları, doğrudan kullanılan etkin maddenin ve taşıyıcının özelliklerine bağlıdır. Topikal preparatlarda ilaç etkin maddesi taşıyıcı sistemden difüze olarak etki bölgesine ulaşır, sonrasında cilt tarafından emilir. İlacın taşıyıcı sistemde salım hızını arttırmak, perkütan absorpsiyonun iyileşmesine neden olabilir. Ayrıca uygulama, ilaç etkin maddesinin karaciğerin ilk geçiş metabolizmasından kaçınılmasını sağlayarak artan biyoyararlanım ve uzun süreli salım sağlamaktadır (Parpani vd., 2014).

İlaçların topikal formülasyonlarla uygulanması, epiderminin tabakası olan *stratum corneum*'un bariyer özelliği ilaçların penetrasyonunu ve birikmesini engelleyerek onların etkinliğini sınırlar (Dragicevic-Curic vd., 2010).

2.3.2. Topikal ilaç salım sistemleri

Topikal ilaç salım sistemleri, ilaç etkin maddesinin deriyle temasını ve/veya deri yoluyla geçişini sağlayan taşıyıcılardır. Bazen taşıyıcı sistemin kendisi de belirli terapötik özelliklere sahip olabilir. Taşıyıcı sistem bir veya daha fazla tıbbi olmayan yardımcı maddeden oluşabilir. Yardımcı maddeler kombinasyonu kozmetik olarak kabul edilebilir olmalı, tahriş edici ve alerjik etkileri olmamalıdır. Bu yardımcı maddeler, etkin maddenin sistemden yeterli miktarda salımına olanak sağlamalı, *stratum corneum*'dan kolaylıkla geçişini temin etmeli ve bileşenlerle kristallik oluşum yaratarak tutunmamalıdır. Etkin madde uyumlu olmayan bir taşıyıcı sisteme yüklendiğinde, preparatın etkinliği azalabilir. Etkin madde ve taşıyıcı sistem arasındaki etkileşimi, yardımcı maddelerden biri veya hepsiyle uyumsuz olması formülasyonun kararsızlığına, dolayısıyla preparatın yararsızlığına neden olabilir. Etkin maddenin taşıyıcıdaki bileşenlere bağlanması, uygulama bölgesine yeterli konsantrasyonun sağlanmamasına neden olabilir. Aynı zamanda topikal taşıyıcı sistemler, ilacın uygulandığı hastanın cildiyle uyumlu olmalıdır (R. Garg vd., 2020).

Topikal preparatların hastalar üzerinde uygulanması oldukça ince tabaka halinde yapılmalıdır. Bunun sebepleri, kalın tabaka halinde uygulanmış preparat hasta tarafından olumsuz algılanabilir ve bilinçli veya bilinçsiz şekilde daha geniş alana yayılabilir (R. Garg vd., 2020).

2.3.2.1. Merhem

Merhemler, yarı katı, viskoz hem çözülmüş hem de süspande olmuş bileşenlerin bulunduğu preparatlardır. Merhem bazının, diğer bileşenler eklenmeden erime sıcaklığının üzerine kadar ısıtılması gerekmektedir. Merhem bazı veya hazırlanması tamamlanmış formülasyon, yoğun ve soğuk ise genellikle düşük kesme ve karıştırma hızı kullanılmaktadır. Bileşenlerin eşit bir şekilde dağıtılması için, kesme ve karıştırma hızı merhem bazı sıvı haldeyken arttırılabilir. Merhem hazırlanmasında kullanılan karıştırıcılarda, ters dönen çift hareketli bıçaklar kullanılır. Bu bıçaklar, karışımı sürekli olarak hareket halinde tutar ve kabın bütün bölmelerine verimli sıcaklık aktarılmasını sağlar (R. Garg vd., 2020).

Tüm merhemlerin esas olarak ilaç etken maddeleri için taşıyıcı görevi icra eden bazdan oluştuğu bilinmektedir. Bazın doğası, onun performansını kontrol etmektedir. Bundan dolayı merhem bazının seçimi başarılı formülasyon hazırlanması için oldukça önemlidir. Merhemler, ilaçların hedeflenenin dışında etki göstermesini önleyen, böylelikle yan etkilerden kaçınılmayı sağlayan, ilacın bölgeye özel uygulamasını temin eden preparatlardır. İlaç etkin maddesinin ilk geçiş metabolizmasından kaçınması, merhemler için de geçerlidir. Merhemler, ağızdan uygulama ile ilaç almakta zorluk çeken, özellikle bilinci kapalı hastalar için uygun yöntemlerden biridir. Kimyasal olarak nispeten kararlı dozaj şeklidir ve kullanımını sıvı dozaj şekillerine göre daha kolaydır. Merhemler aynı zamanda tadı acı olan ilaçların uygulanması için elverişli dozaj formlarıdır (R. Garg vd., 2020).

2.3.2.2. Krem

Kremler viskoz yarı katı preparatlardır. Yapısal olarak genellikle sulu kremler (su içinde yağ emülsiyonu) veya yağlı kremler (yağ içinde su emülsiyonu) olarak ayrılmaktadırlar. Kremlerde emülsiyon tipi ilaç etken maddesinin çözünürlüğüne bağlı olarak seçilmektedir. İlaç etkin maddesinin emülsiyonun sürekli fazında çözündüğü bilinmektedir. Bu nedenle suda çözünen ilaç etken maddeleri su içinde yağ emülsiyonlarında dağılmaktayken, yağda çözünen ilaç etken maddeleri yağ içinde su emülsiyonlarında dağılmaktadır (Weiss, 2011).

Kremler oklüziv etkinin gerekemediği durumlarda tercih edilmektedir. Ek olarak, cilde yumuşatıcı, nemlendirici ve serinletici etkileri için de kullanılmaktadır. Hassas ve nemli cilt koşulları için dermatitin seröz eksüdası ile emülsiyon oluşturma özellikleri

nedeniyle kremler, sıklıkla tercih edilmektedirler. Bu preparatlar, zarif görünümü, cildin üzerinde kolaylıkla dağılmaları, sürülme zamanı, cilt üzerinde çok az veya hiç iz bırakmamaları, nispeten daha az yağlı olmalarından dolayı kullanıcılar tarafından tercih edilmektedir (Weiss, 2011).

2.3.2.3. Pat

Patlar merhemler gibi cilde harici uygulama için tasarlanmış taşıyıcı sistemlerden biridir. Merhemlerden farklı olarak patlar daha yüksek oranda katı madde içermeleri ve böylece, katı yüzdelерinin yüksek olması nedeniyle merhemlerden daha yoğun ve katı olmalarıyla farklılık göstermektedirler. Patlar genel olarak hazırlanmasında aynı bileşenlerin kullanıldığı merhemlere oranla daha az yağlı ve emici olurlar. Patların yoğunluk ve emici özellikleri sayesinde, uygulanma sonrası çok az akma ve yumuşama eğilimi gösterirler. Bu özellikleri onların uygulama bölgesindeki seröz salgıları emmek amacıyla aktif kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu sebeple patlar, sızıntı eğilimi, kabuklanma ve vezikülasyon gibi eğilimleri bulunan akut lezyonlar için merhemlere tercih edilmektedir. Ek olarak, kıvamaları ve geçirgen olmamalarından dolayı cildin kıllı bölgelerinde kullanıma uygun değildir (Bhowmik, 2012).

2.3.2.4. Köpük

Köpükler, aktivasyon sonucunda köpük kafesi oluşturabilen hidrokarbon itici gazla alüminyum kutunun içine yerleştirilmiş basınçlı sıvılardır. Kafesin yapısı, fiziksel stresi ve sıcaklık değişimlerini önlemek için hazırlanmaktadır. Uygulanma zamanı köpüklerin uçucu bileşenleri buharlaşır, böylece ciltte minimum miktarda kalıntı kalır. Köpükler su, yağ ve çözücü olmak üzere üç fazdan oluşmaktadır (Weiss, 2011).

Köpükler, yayılma kolaylığı ve ciltte düşük miktarda kalıntı bırakması nedeniyle kozmetik bakımdan görünümü etkilemez. Cildin kıllı ve kılsız alanları için kullanılabilirler. Köpüklerin dezavantajı, sistemin esasına bağlı olarak kullanım esnasında, soyulmuş deride yanma ve batma hissi oluşturabilirler (Weiss, 2011).

2.3.2.5. Emülsiyon

Emülsiyonlar, birbirinde karışmayan iki sıvı fazdan (su ve yağ) oluşan heterojen sistemler olup, bu fazlardan biri mekanik karıştırma sonrası diğer faz boyunca küçük damlacıklar şeklinde dağılır. Emülsiyonlar bir nevi sıvı-sıvı kolloid olarak kabul görürler. Küçük damlacıklar şeklinde dağılmış faz dispers faz, çevresindeki sıvı ise sürekli faz

olarak adlandırılmaktadır. Emülsiyonların sınıflandırılması sürekli fazın su veya yağ olmasına bağlı olarak su içinde yağ veya yağ içinde su emülsiyonu olarak yapılmaktadır (Lu ve Gao, 2010).

Emülsiyonlar, dağılmış dispers faz ve sürekli faz damlacıklarının birleşmesi sonucu oluşan faz ayrışması oluşturabilmesi nedeniyle termodinamik bakımdan kararsızdırlar. Bu nedenle emülsiyonlar yüzey aktif maddeler (Yüzey etkin maddeler, YEM, sürfaktan) olarak adlandırılan emülsifiye edici bileşenlerle stabilize edilir. Birbiriyle karışmayan iki sıvı fazın güçlü bir şekilde çalkalanması sonrası, daha hızlı birleşen damlacıklardan sürekli faz oluşur. Bu ise genel olarak miktarca daha fazla olan sıvıdan oluşmaktadır. Bunun sebebi damlacık sayısı arttığı zaman çarpışma ve birleşme olasılığının da artmasıdır. Emülsiyonların parçacık boyutu 0.1 ila 100 µm arasında değişmektedir. Yüzey aktif madde veya yardımcı yüzey aktif maddeler yardımıyla oluşturulan emülsiyonun tipi, bu maddelerin yağ veya su fazı içerisinde çözünmesi sonucunda belirlenir. Genel olarak yüzey aktif maddelerin en fazla çözünmüş olduğu faz, sürekli faz haline gelmektedir. Dolayısıyla, hidrofillik yüzey etkin maddeler su içinde yağ, lipofillik yüzey etkin maddeler ise yağ içinde su emülsiyonlarının oluşmasına sebep olur. Emülsiyonlar, kozmetik ve topikal farmasötik ürünler olarak yaygın olarak kullanılırlar. Ticari olarak mevcut olan en büyük emülsiyon grubu, topikal uygulama için kullanılan dermatolojik preparatlardır (Lu ve Gao, 2010).

2.3.2.6. Süspansiyon

Süspansiyonlar iki fazlı heterojen sistemlerdir. Dış faz veya sürekli faz genellikle sıvı veya yarı katı, iç faz ise, sürekli faz boyunca dağılmış, genellikle çözünmemiş katı parçacıklardan oluşur. İç faz farklı parçacıklardan oluşabilir veya parçacıklar arası etkileşimler sonucu ortaya çıkan parçacık ağı oluşturabilir. Süspansiyonlar floküle ve defloküle edilmiş olmakla ikiye ayrılır. Neredeyse bütün süspansiyon sistemi ayrıışmış şekildedir. Bu nedenle, süspansiyon hazırlanırken dikkat edilmesi gerekenler, olası çökelme oranını azaltmak ve çöken herhangi bir maddenin yeniden süspande olabilmesini sağlamaktır. Başarılı bir süspansiyon sistemi, en azından çalkalandıktan sonra gerekli dozu sağlamalı ve uygulama süresince homojen kalmalıdır (Bhowmik, 2012).

2.3.2.7. Jel

Topikal uygulama için jeller, ilacın hedef bölgeye ilaç salımı için yaygın kullanılmaktadır (Garg vd., 2014). Jeller, iki bileşenli, zengin miktarda sıvı içeren, yarı katı preparatlardır (Al-Khashab vd., 2010). Jel fazı, kendisi ile az miktarda jelleştirici maddeden oluşmuş makromoleküler bir lif ağı arasında ortaya çıkmış yüzey geriliminden dolayı hareketsizleştirilmiştir (Singh ve Banarasi, 2010). Katı benzeri özellikler gösteren sürekli yapının varlığı jelin tek karakteristik özelliğidir (Al-Khashab vd., 2010). Bu yarı katı jel sistemleri, üç boyutlu, içerisinde yüksek derece fiziksel veya kimyasal retikülasyonu kapsayan polimerik matrisi oluşturur. Geri dönüşümlü olmak kaydıyla belli noktalarda birbirine bağlanmış, uzun ve düzensiz zincirlerden oluşmaktadırlar (das Neves ve Bahia, 2006).

Genel olarak lif veya şerit görünümünde olan fiziksel jellerin hazırlanmasında üç boyutlu matrisin bir arada tutulması, van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağlantıları gibi zayıf çekme kuvvetleriyle sağlanırken, kimyasal jellerde bu daha kuvvetli kovalent bağlar sayesinde mümkün olur. Sıvı bileşen olarak su kullanılarak hazırlanan jeller hidrojel, organik çözücü kullanılan jeller ise organojeller adlandırılmaktadır. Formülasyonda kullanılan jel yapıcı maddelerin tipine bağlı olarak hazırlanmış jel, hidrojel veya organojele ek olarak küçük moleküler ağırlıklı veya polimerik jel olarak da sınıflara ayrılabilir. Küçük molekül ağırlıklı jel yapıcı maddeler, onları ısı ile dönüşümlü hale getiren kalıcı kristallik ağlar yoluyla katı halde elyaf matris veya devamlı olarak yeni şekiller alan kovalent olmayan geçici bir yapısal ağ sayesinde sıvı halde bir elyaf matrisi oluştururlar. Polimerik jeller ise, çapraz ve kovalent bağlarla organik çözücüleri doğrusaldan dallanmış polimerlere kadar değişmekte olan monomer birimlerinin dizinlerinden oluşmaktadır. Farklı fizikokimyasal özellikler taşıyan jeller, birçok farklı jel yapıcı madde ve çözücülerin gösterdiği kimyasal özelliklere ek olarak jelleşme sıcaklığı, soğutma hızı vs. gibi jel hazırlama aşamasındaki koşullara bağlı olarak istenilen özelliklerde formüle edilebilmektedir (Kang vd., 2013).

Yaygın olarak kullanılan jel yapıcı maddelere jelatin, karboksi jelatin, selüloz türevleri (karboksi metil selüloz, hidroksi propil selüloz, hidroksi etil selüloz, metil selüloz, etil selüloz), aljinik asit, bentonit, karbomer, magnezyum alüminyum silikat,

polivinil alkol, poloksamerler, sodyum aljinat ve kitre zamkı örnek gösterilebilir (Al-Khashab vd., 2010).

2.3.2.7.1. Jellerdeki yardımcı maddeleri

Jeller, jel yapıcı maddelere ek olarak bir veya daha fazla aktif bileşenlerin dispersiyon veya çözeltilerinin yarı katı preparatlarıdır. Jelleştirici ajanlar olan stabilizatörler, koyulaştırıcı ajanlar ve katılaştırıcılar psödoplastik özellik gösterir ve jelin kıvamını tiksotropik yapar. Jel yapıcı maddeler soğuk suda sıcak suya kıyasla daha fazla çözünmektedirler. Jel yapıcı maddeler toplam formülasyonun %0.5-10 konsantrasyon aralıklarında kullanılmaktadır (Garg vd., 2014).

Jellerde yardımcı maddeler olarak kullanılan polimerlerin rolünü aşağıdakiler ile ifade etmek mümkündür:

1. İlaç salım sistemlerinin güç ve sertliğini ayarlamak amacıyla;
2. Suda çözünmeyen polimer kullanıldığı zaman çökmenin engellenmesi için;
3. Suda çözünür polimer kullanıldığı zaman çökertici madde olarak.
4. Şekil koruyucu ajan olarak;
5. İlacın tadını ve kokusunu maskelemek amacıyla;
6. Ortamın nemini korumak amacıyla kaplayıcı olarak kullanılabilir (Yonese, 2001).

Jeller, hazırlanmasında kullanılan malzemelerin doğasına göre, gıda, tıbbi implantlar, ilaç taşıyıcı sistemlerden kozmetiklere kadar geniş çaplı endüstriyel kullanım alanına sahiptirler (Kang vd., 2013). Jeller uygulaması kolay preparatlardır ve uygulama sonrası içerdiği suyun buharlaşması hoş hissettiren soğutma etkisi oluşturur. Suyun buharlaşması sonrası ilaç etken maddesi oluşan ince jel filmin içerisine hapsolür ve fiziksel olarak cildi kaplayan matris oluşturur. Genel olarak kalıntı film cilde iyi bir şekilde yapışarak koruma sağlar, tedavi sonrasında ise yıkama yoluyla kolayca uygulama yerinden arındırılabilir (Al-Khashab vd., 2010).

Mikro yapı ağları aracılığıyla ilaç salımı, jel matrisinde hapsedilmiş ilaç etken maddesi moleküllerinin matristen kontrollü olarak uzun bir süre salınabilmesine olanak sağlar. Buna ek olarak bir jel salım sistemi, lokal terapötik etki gerektiren durularda

lokalize yüksek ilaç konsantrasyonunun korunabilmesi avantajını sunmaktadır (Kang vd., 2013).

Jel yapıcı madde olarak genellikle polimerler kullanılmaktadır. Ek olarak, bazı polimerler biyolojik olarak *in vivo* bozunabilmektedir ve bu zaman oluşabilecek toksisite endişeleri, farmasötik endüstride jellerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır (Kang vd., 2013).

2.4. Kitosan Jel

Kitosan, toksik ve immünöjenik olmayan doğasının sahip olduğu mükemmel biyobozunurluk, hızlandırılmış yara iyileştirme, antimikrobiyal etkinlik gibi özellikleri ile dikkat çeken polimerdir (R. Singh vd., 2017). Kitosanın biyoyumluluğu, onun potansiyel ilaç taşıyıcı, enjeksiyon, antiasit ve antiülser, biyomedikal uygulamalar, implantasyonlar gibi farklı tıbbi uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Moussaoui vd., 2012). Hemostaz stimülasyonu, doku rejenerasyonunu hızlandırması ve antimikrobiyal etkisi kitosanın yara iyileştirici özelliklerini ortaya koyan faktörlerdir (Varshosaz vd., 2018). Kitosarla hazırlanmış formülasyonlar, jellere benzer olarak makroskopik davranış, etkin maddelerin oksidasyonu ve fotodegradasyonunu en aza indirebilen moleküler karışıklıklar ortaya çıkarma özelliğine sahiptirler (Campos vd., 2020).

Kitosan, asit çözeltilerinde kendiliğinden jel oluşturmaktadır (Campos vd., 2020). Kitosan jelinin inflamatuvar hücrelerin büyümesini yavaşlatma, fibroblast proliferasyonunu uyarma, makrofajları aktiveleştirme, daha düşük fibroplazi derecesi sağlama, yeniden epitelizasyonu teşvik etme, bağışıklık sistemini uyarma, düşük toksisiteli, oksijen geçirebilir, hemostatik özellikleri ve antitümör etkinliğe sahip olması, onun yara iyileştirici olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Farklı maddelerle kombinasyon, kitosan jeline yara iyileştirici özelliklerini optimize eden ve genişleten ek özellikler kazandırabilmektedir (Ferreira vd., 2020).

Kitosan jelleri oluşturmak için “fiziksel” veya “kimyasal” yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan kimyasal yöntemde kalıcı ağlar oluşturması için kovalent bağlar kullanılmaktadır (Sacco vd., 2018). Fiziksel jeller, reaktiflerden veya toksik olan çapraz bağlayıcılardan kaçınma potansiyeline sahip olmaları gibi avantajlar

sunmaktadırlar. Ancak bunlar, kimyasal jellere kıyasla *in vivo* olarak daha düşük dayanıklılık göstermektedir ve ömürleri birkaç günden birkaç aya kadar değişmektedir. Fiziksel jeller özellikle kısa süreli ilaç salımı için iyi bir çözümdür. Nisbeten zayıf mekanik güce sahip olmaları ve *in vivo* kontrolsüz çözünme özellikleri fiziksel jellerin daha geniş yelpazede kullanılmasını sınırlayan faktörlerdir (Nilsen-Nygaard vd., 2015).

Uyumlu karşı iyonların eklenmesi ve pH, sıcaklık, iyonik kuvvetin değişmesiyle fiziksel jellerin sol/jel geçişine potansiyel olarak ulaşılabilir. İyonik kuvvet ve pH, jel oluşmasında anahtar rol üstlenmektedirler. Hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler hidrojen bağlarıyla birlikte dolaşık ağları oluşturmak için birlikte çalışırlar. Çözeltinin sahip olduğu pH değerine bağlı olarak kitosan, polielektrolit gibi davranış sergiler. Bu, kitosanın pH 4-6 aralığında zıt yükler taşımakta olan iyonlar, makroküreler veya küçük moleküllerle etkileşime girebileceği anlamını verir. Hidrojen bağlarının ve hidrofobik etkileşimlerin rolüne bağlı olarak, yardımcı çözücülerin kullanımı ve polimer kimyasal yapısı gibi ilave değişkenler kitosanın jelasyonunu etkileyebilir (Sacco vd., 2018).

Kimyasal olarak çapraz bağlı kitosan jelleri, iyi ağ boyutu kontrolü ve ideal mekanik özellikler sunmaktadır. Reaktif ve toksik çapraz bağlayıcıların jelin nihai oluşumu sonrası etkili bir şekilde çıkarılması şartıyla, ilaç salım uygulamaları için kolay jel özellikleri optimizasyonu sağlar. İmplant edildiği zaman *in vivo* jelleşen ve böylelikle düşük kritik çözelti sıcaklığından vücut sıcaklığına çıkan bir sıvı polimer-ilaç çözeltisi enjeksiyonuna olanak sağlayan, kitosanın *β-gliserol fosfat* ile termo-tersinir jellerinin kullanımı bunların ilginç özelliğidir. Başka bir yerinde jelleşme sisteminde (*in situ* jel oluşumu) ise pH'e bağlı kitosan çözünürlüğüne dayanmaktadır. Buna örnek olarak, kitosan ile poliakrilik asitin karışımı pH 6.0 ortamında sıvı haldedir, fizyolojik pH 7.4 ortamında ise hızla jelleşir. Enjekte edilebilen bu jeller cerrahi jel implantasyonu ihtiyacını karşılar ve vücutta şekli düzensiz olan doku bölgelerinin tedavisi için avantaj sağlar (Nilsen-Nygaard vd., 2015).

Kitosan jelinin sağladığı minimum jelleşme ve nispeten düşük mekanik mukavemet, onun kullanımını sınırlayan faktörlerdir, bunun da üstesinden diğer polimerler ve yardımcı maddeler ile kombinasyon yoluyla gelinebilir (Ramanathan ve Block, 2001; Varshosaz vd., 2018).

2.5. *Helichrysum* Geartner Cinsi

Türkiye, floristik bakımdan üç bölgenin kesişmesinde bulunmaktadır ve bu nedenle oldukça zengin bitki örtüsüne sahiptir. Türkiye florasının endemiklik oranı %30 civarında olup, buraya *Asteraceae* familyasına mensup 140 cins, 1186 tür dahildir (Bülbül vd., 2013). *Asteraceae* familyasından olan *Helichrysum* Geartner cinsi bütün dünyada yaygın olan ortalama 500 türü içerir. Türkiye florasında bu cins, Anadolu’da yaygın bulunan 15’i endemik olmakla toplam 27 taksonla temsil edilmektedir (Albayrak vd., 2010). Cinsin adı Yunanca “*helios*” (güneş) ve “*kryos*” (altın) sözcüklerinden oluşmaktadır. Anadolu’da farklı bölgelerde bu bitkilere oldukça farklı isimler verilmiştir. Bununla birlikte, *Helichrysum* Geartner cinsi genellikle “ölmez çiçek” adıyla bilinmektedir (Eroğlu, 2018).

Araştırmalara göre bu cinsten olan bitki türleri flavanoitler ve floroglusinol türevleri başta olmakla fenolik bileşikler açısından oldukça zengindir (Akaberi vd., 2019). Bitkilerde fenolik bileşikler normal gelişimleri sırasında ve kısmen yaralanma, UV radyasyon, böcek saldırılarına maruz kalma gibi fizyolojik ve ekolojik baskılar nedeniyle sentezlenir (Khoddami vd., 2013). Fenolik bileşikler, antioksidan ve antimikrobiyal etki gibi özellikleri dahil birçok fizyolojik etkileri sebebiyle geniş ilgi görmektedir. Fenoliklerin antioksidan etkinlikleri, onların redoks özelliklerine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Albayrak, vd., 2010). Antioksidanlar serbest radikale bir elektron verir, böylece onu zararsız moleküle çevirir (Haminiuk vd., 2012).

2.5.1. *Helichrysum pamphylicum* Davis & Kupicha

Helichrysum Geartner cinsinden olan *Helichrysum pamphylicum* çok yıllık otsu bitki olup, 30-45, bazen 60 cm boyunda, dik, dallanmamış gövdeye sahiptir. Tabandaki yapraklar linear-spatulat, gövdedeki yapraklar ise dar, linear-oblanseolat. Tepe kısmı akut olup, gövdesindeki yapraklar yukarıya doğru çıktıkça küçülmektedir. Korimbus sık olup, genişliği 2-2.5 cm’dir ve 15-45 adet kapitulum taşır. Kapitulumlar aynı zamanda gövdeden de çıkar. Kapitulum şekli ovoid olup, 5-6 mm boyundadır, 15-20 adet çiçek taşır. Kapitulum sapı tomentozdur. Sayıları 30-35 kadar olan involukrum brakterleri konkav, gevşek imbrikat dizilmiş olup, rengi donuk-kar beyazıdır. Dış taraftaki çiçekler dışidir. Bitkinin çiçeklenmesi Mayıs-ağustos aylarında olur (Tanker ve Sezik, 1978).

Helichrysum pamphylicum endemik bitki olup, genellikle Antalya'da yayılmıştır. Kızılcım ormanlarında, kireçli kayaların arasında yetişmektedir (Tanker ve Sezik, 1978).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

<u>Madde adı</u>	<u>Firma adı</u>
ABTS ^{•+}	Sigma-Aldrich, Almanya
Agaroz	(Fluka, İspanya)
BHT	Sigma-Aldrich, Almanya
DPPH [•]	Sigma-Aldrich, Almanya
EDTA	Sigma-Aldrich, Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich, Almanya
FeCl ₂	Sigma-Aldrich, Almanya
FeCl ₃	Sigma-Aldrich, Almanya
Ferrozin	Sigma-Aldrich, Almanya
K ₂ S ₂ O ₈	Sigma-Aldrich, Almanya
K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	Sigma-Aldrich, Almanya
Kitosan (HMW)	Sigma-Aldrich, İzlanda
Kitosan (LMW)	Sigma-Aldrich, İzlanda
Kitosan (MMW)	Sigma-Aldrich, İzlanda
Laktik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat dibazik	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich, Almanya
SDS	(Fluka-Biochemika, Almanya)
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya

Sodyum salisilat	Sigma-Aldrich, Almanya
TCA	Sigma-Aldrich, Almanya
Vit C	Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Buz Dolabı	Arçelik, Türkiye
Derin Dondurucu	Liebherr LGEX 3410 Medline, İsviçre
Distile su cihazı	MiliQ Milipore, Fransa
Diyaliz Zarı	Sigma-Aldrich, Amerika
Hassas terazi	Ohaus E1 2140, ABD
Liyofilizatör	Scanvac-Coolsafe Pro, Danimarka
Manyetik karıştırıcı	Jeitech MS-53M, Güney Kore
Mikropipet seti	Eppendorf, Almanya
pH metre	Mettler Toledo, İspanya
Prob sonikatör	Sonics, Amerika
Reometre	Brookfield, Amerika
Santrifüj 1	Eppendorf 5810, Almanya
Santrifüj 1	Nüve NF400, Türkiye/
Su banyosu	GFL, Tissue float bath 1052, Almanya
Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Kore
UV-Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	Jeo Tech, Kore

4. YÖNTEM

4.1. Formülasyonların Hazırlanması

Kitosan bazlı boş jel formülasyonları, literatür taraması ardından bazı ufak modifikasyonlarla hazırlanmıştır (Akıncıbay vd., 2007; Alemdaroğlu vd., 2006; Alsarra, 2009). Boş jel formülasyonları, farklı oranlarda (%0.5 *a/h*, %1.0 *a/h*, %1.5 *a/h*) yüksek (HMW), orta (MMW) veya düşük (LMW) moleküler ağırlıklı kitosan, %1 (*h/h*) sulu laktik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır. Test edilen numunelere koruyucu olarak sodyum salisilat (%0.2, *a/a*) eklenmiştir. Numuneler manyetik karıştırıcıda 250 rpm, oda sıcaklığı koşullunda karıştırılmış ve elde edilen boş jellerin, hava kabarcıklarını gidermek için sonikasyona tabi tutulmuştur. Hava kabarcığı giderilen jeller analizler için numune kaplarına alınmış ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.1.'de hazırlanan jellerde bulunan kitosan oranları sunulmuştur.

Tablo 4.1. Hazırlanan formülasyonlardaki kitosan oranları

Formülasyon Kodları	Kitosan		
	Düşük Moleküler Ağırlıklı Kitosan	Orta Moleküler Ağırlıklı Kitosan	Yüksek Moleküler Ağırlıklı Kitosan
	(LMW)	(MMW)	(HMW)
F1	% 0.5	-	-
F2	% 1.0	-	-
F3	% 1.5	-	-
F4	-	% 0.5	-
F5	-	% 1.0	-
F6	-	% 1.5	-
F7	-	-	% 0.5
F8	-	-	% 1.0
F9	-	-	% 1.5

HP metanol ekstresi içeren kitosan jel formlasyonları toplamda %0.1 (10 gram jelde 10 mg) oranında HP metanol ekstresi içecek şekilde hazırlanmıştır. Boş jel formülasyonlarında olduğu gibi numuneler manyetik karıştırıcıda 250 rpm, oda sıcaklığı koşullunda karıştırılmış ve elde edilen jellerin, hava kabarcıklarını gidermek için sonikasyona tabi tutulmuştur. Hava kabarcığı giderilen jeller analizler için numune kaplarına alınmış ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Hem boş hem de HP metanol ekstresi içeren kitosan jellerde öncelikle pH ölçümü yapılmıştır. Formülasyonlar pH ayarı için sodyum bikarbonat kullanılarak tekrardan hazırlanmış ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu alışma kapsamında hazırlanan formülasyonların içeriği Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. 10 gram jel için formülasyon içerikleri

Kod	LMW	MMW	HMW	SS	SB	HP	LA
F1	0.05 g	-	-	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F2	0.10 g	-	-	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F3	0.15 g	-	-	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F4	-	0.05 g	-	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F5	-	0.10 g	-	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F6	-	0.15 g	-	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F7	-	-	0.05 g	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F8	-	-	0.10 g	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F9	-	-	0.15 g	0.02 g	0.035 g	-	y.m.
F1-HP	0.05 g	-	-	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F2-HP	0.10 g	-	-	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F3-HP	0.15 g	-	-	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F4-HP	-	0.05 g	-	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F5-HP	-	0.10 g	-	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F6-HP	-	0.15 g	-	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F7-HP	-	-	0.05 g	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F8-HP	-	-	0.10 g	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.
F9-HP	-	-	0.15 g	0.02 g	0.035 g	10 mg	y.m.

***LMW:** Düşük molekül ağırlıklı kitosan, **MMW:** Orta molekül ağırlıklı kitosan, **HMW:** Düşük molekül ağırlıklı kitosan, **SS:** Sodyum salisilat, **SB:** Sodyum bikarbonat, **HP:** *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi, **LA:** %1 (a/h) laktik asit sulu çözeltisi, **y.m.:** yeterli miktar.

4.2. Formülasyonların Karakterizasyonu

4.2.1. Formülasyonların fiziksel görünüşünün değerlendirilmesi

Hazırlanan jel formülasyonları, renk ve homojenlik açısından görsel olarak incelenmiş ve görüntüleri alınmıştır.

4.2.2. Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi

Boş ve HP metanol ekstresi içeren kitosan jellerin pH değerleri, dijital pH metre (Mettler Toledo™ S220 Seven Compact™ pH / Ion Benchtop Meter) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi

Reolojik özellikler, 40 mm çapında bir koni-plaka geometrisine sahip reometre (Brookfield, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler ve viskozite değişiklikleri $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıklarda üç kez tekrarlanmıştır. Kayma gerilimine karşı kayma hızları grafikleri oluşturulmuş ardından akış modellerine uygunluk değerlendirilmesi yapılmıştır.

4.2.4. *Helichrysum pampylicum* metanol ekstresi için analitik validasyon çalışması

4.2.4.1. Absorbans belirleme

HP metanol ekstresinin maksimum absorbansını (λ_{max}) belirlemek için stok çözelti hazırlanmıştır. Tam olarak tartılmış 10 mg HP metanol ekstresi, pH 5.5 PBS ile yıkanarak balon jöjeye alınıp 10 mL hacime pH 5.5 PBS ile tamamlandıktan sonra on dakika ultrasonik banyoda tutulması ile hazırlanmıştır. Sonuç stok çözeltisinin konsantrasyonun $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmasından hareketle, seyreltme ile $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Elde edilen solüsyon UV aralığında (200-400 nm) taranmıştır (Jain vd., 2011).

4.2.4.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığının değerlendirilmesi için, 5.0 ile $60.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $30.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $40.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$) arasında değişen yedi konsantrasyon seviyesinde HP çözeltisi örnekleriyle oluşturulan üç orijinal eğrinin ortalaması kullanılmıştır. Çözeltiler, stok standart çözeltinin ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pH 5.5 PBS içinde seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Absorbanslar, 308 nm' de üç

kopya halinde ölçülmüştür. Eğri, konsantrasyona karşı absorbandsın ortalama değerlerinin temsili ile oluşturulmuştur. Sonuçlar en küçük kareler yöntemi ile doğrusal regresyon ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir (da Silva Luna vd., 2022).

4.2.4.3. Kesinlik

HP'e ait analitik yöntemin kesinlik çalışmalarında, tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla kalibrasyon aralığına denk (5.0-60.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) gelen 3 farklı konsantrasyonda (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) HP içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 ölçüm tekrarı yapılmıştır (Öztürk, 2017).

4.2.4.4. Doğruluk

Geri kazanım, konsantrasyon analizinin %100'ünde numunelere bilinen artan miktarlarda standart HP (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) solüsyonunun eklenmesiyle belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri, deneysel olarak belirlenen toplam HP oranı ve teorik konsantrasyonları için yüzdeler olarak ifade edilmiştir. Her numune üç kez test edilmiş ve geri kazanılan miktar hesaplanmıştır (Araújo vd., 2013).

4.2.4.5. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü/seçiciliği, standart çözeltinin (HP), miktar tayini ve *in vitro* dissolüsyon için kullanılacak pH 5.5 PBS ve boş formülasyonun (F9) 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Araújo vd., 2013).

4.2.5. Formülasyonlardaki *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi miktarının belirlenmesi

Öncelikle tam olarak tartılmış 0.5 g jel, 25 mL pH 5.5 PBS içinde çözülmüştür. Jel solüsyonunu içeren reaksiyon şişesi, HP'nin tam çözünürlüğünü elde etmek için manyetik karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu çözelti, membran filtre (0.45 μm) kullanılarak süzölmüş ve ardından uygun seyreltmeler sonrasında '4.2.5. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi için analitik validasyon çalışması' bölümünde geliştirilen UV-spektrofotometre yöntemi ile analiz edilmiştir. Ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

4.2.6. *In vitro* dissolüsyon çalışması

HP ve HP içeren kitosan jelin *in vitro* dissolüsyonu, etkin difüzyon alanına sahip Sigma-Aldrich diyaliz zarı [D9652-100FT, Dialysis Tubing Cellulose Membrane, tipik

moleküler ağırlık sınırı = 14.000, ortalama düz genişlik 25 mm (1.0 inç), Sigma-Aldrich ABD] kullanılarak membran difüzyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Tam olarak tartılmış 2.5 mg HP ve 2.5 mg HP içeren kitosan jel önceden gece boyunca çözünme ortamında (taze hazırlanmış fosfat tamponu/PBS pH 5.5) ıslatılmış olan diyaliz zarına aktarılmıştır. Zar her iki uçtan sıkıca kapatılmıştır. İki ucu kapatılmış zarlar $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutulan 80 mL çözünme ortamında aktarılmış ve 100 rpm'de karıştırılmıştır. Her biri 3 mL hacme sahip örnekler, önceden belirlenmiş 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24 ve 48 saatlik zaman aralığında periyodik olarak çekilmiş ve dissolüsyon koşullarını korumak için eşit hacimde taze ortam ile amber beherlere eklenmiştir. Alınan numuneler bir membran filtre (0.45 μm) ile süzölmüş ve 308 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Deney bağımsız olarak üç kopya halinde yürütölmüştür ve kümülatif salım grafikleri çizilmiştir (Abdelmalak ve El-Menshawe, 2012).

4.2.7. Salım kinetiği

Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan jelin salım kinetik parametreleri ve baskın ilaç salım mekanizmasını belirlemek için farklı salım kinetiği modellerine uygunluğu değerlendirilmiştir. Bu amaçla kırk çözünme modelini içeren yerleşik bir model kitaplığına dayalı doğrusal olmayan optimizasyon yöntemlerini kullanarak çözünme verilerinin modellenmesini kolaylaştırmak için kullanılabilen DDSolver adlı çok yönlü ve ücretsiz olarak kullanılabilen bir eklenti programı kullanılmıştır (Zhang vd., 2010).

4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.3.1. *In vitro* antioksidan aktivite çalışmaları

4.3.1.1. *Metal şelatlayıcı yöntem*

HP metanol ekstresi, ekstreyi içeren jel ve boş formölasyonlarının demir iyonlarını şelatlama kabiliyetleri Orhan ve Üstün'ün çalışması modifiye edilerek tayin edilmiştir (Orhan ve Üstün, 2011). 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda HP ekstresi içeren jel ve aynı konsantrasyonda ekstre ve boş formölasyonları üzerine 40 μL FeCl₂ (2mM) ve 80 μL Ferrozin (5mM) eklenmiş ve metanolla 2 mL'e tamamlanmıştır. 15 dakika bekleme işleminin ardından 562 nm'de absorbanslar okunmuş, pozitif kontrol olarak EDTA (mg.mL⁻¹) kullanılmıştır (n=3). Metal şelatlama kapasitesini (%) hesaplamak için

denklem 4.1. kullanılmıştır. Denklem 4.1.'de A_{kontrol} , EDTA reaktif çözeltisinin absorbansını belirtirken, $A_{\text{örnek}}$ ekstre içeren reaktif çözeltisinin absorbansını belirtir.

$$\text{Metal Şelatlama Kapasitesi (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (4.1.)$$

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

ABTS'in potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucunda ABTS^{•+} radikal katyonu oluşmaktadır. Her çalışmadan önce taze hazırlanması gereken bu reaktif, 734 nm'de absorbansı 0.700 (\pm 0.02) olacak şekilde etanol ile seyreltilerek antioksidan aktivitenin tayinini için kullanılmıştır. Reaksiyon için, 1 mg.mL⁻¹ HP metanol ekstresi içeren jel formülasyonu ve aynı konsantrasyonda ekstre ve boş üzerine 1 mL reaktif çözeltisi eklenerek 5 dakika beklenmiş ve 734 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Çalışmada kör olarak etanol, pozitif kontrol olarak askorbik asit (Vit C) ve BHT (0.5 mg.mL⁻¹) kullanılmıştır (Re vd., 1999). Spektrofotometrik ölçüm sonrası ABTS^{•+} radikal katyonunun % giderimi denklem 4.2.'e göre hesaplanmıştır. Denklem 4.2.'de A_{kontrol} , ABTS^{•+} reaktif çözeltisinin absorbansını belirtirken, $A_{\text{örnek}}$ ekstre içeren reaktif çözeltisinin absorbansını belirtir.

$$\text{Total Antioksidan Aktivite (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (4.2.)$$

4.3.1.3. Redükleyici güç ölçümü

Redükleyici güç tayini Shon vd. tarafından geliştirilmiş metoda uygun olarak yapılmıştır (Shon vd., 2003). Öncelikle %1'lik $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (potasyum ferrisiyanid) ve 200 mM fosfat tamponu (pH 6.6) hazırlanmıştır. 1 mg.mL⁻¹ HP metanol ekstresi içeren jel, boş formülasyonları ve aynı konsantrasyonda HP metanol ekstresi üzerine 500 μ L fosfat tamponu ve 500 μ L %1'lik $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ilave edilmiş, karışım 50°C'de etüvde 20 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında karışıma 500 μ L %10'luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edilerek 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 500 μ L süpernatant, 500 μ L distile su ve 200 μ L %0.1'lik $FeCl_3$ ile karıştırılarak elde edilen reaksiyon çözeltisinin absorbansı, 700 nm'de örnek içeren reaksiyon karışımına (kör) karşı okunmuştur (n=3). 700 nm'de ölçülen absorbansın

0.5 olduğu konsantrasyon ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) EC_{50} değeri olarak verilmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit (Vit C) ve BHT kullanılmıştır (Y.-R. Lee vd., 2007)

4.3.1.4. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem

Kararlı bir radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali bir elektron veya hidrojen kabul eder. Antioksidanların, bir hidrojen atomunu DPPH radikaline verme yetenekleri nedeniyle süpürücü etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bu yöntem ile antioksidanların stabil DPPH radikalini, indirgenmiş DPPH (DPPH-H) formuna getirme yetenekleri değerlendirilir. Diğer yöntemlere göre daha kısa zamanda sonuç veren bir yöntemdir (Molyneux, 2004). Test edilen ekstrelerden hazırlanan çözeltilerin DPPH• üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno vd. tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir (Sánchez-Moreno vd., 1998). $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ HP ekstresi içeren jel, boş ve aynı konsantrasyonda HP ekstresi üzerine metanolde hazırlanmış 3 mL DPPH ($2 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) çözeltisi ilave edilerek vortekste 30 saniye karıştırılmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 517 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiş, serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan İndeks) denklem 4.3.'e göre hesaplanmıştır. Denklem 4.3.'de A_{kontrol} , kontrol absorbansını belirtirken, $A_{\text{örnek}}$ ekstre içeren reaktif çözeltisinin absorbansını belirtir.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (4.3.)$$

In vitro antioksidan aktivite çalışmaları kapsamında sonuçlar inhibisyon hesaplamalarının ardından IC_{50} verileri SigmaPlot 14.5 programı ile hesaplanarak verilmiştir.

4.3.2. HET-CAM (hen's egg test on the chorioallantoic membrane assay) yöntemi ile *in vivo* antiinflamatuar etkinliğin belirlenmesi

Öztürk ve Kıyan tarafından rapor edilen deney protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır (Öztürk ve Kıyan, 2020). Deneyde kullanılan kuluçkalık civciv yumurtaları Bursa Hastavuk Yumurtacı Damızlık Hayvancılık A.Ş.'nin Sivrihisar şubesinden temin edilmiştir.

4.3.2.1. Pellet hazırlanışı

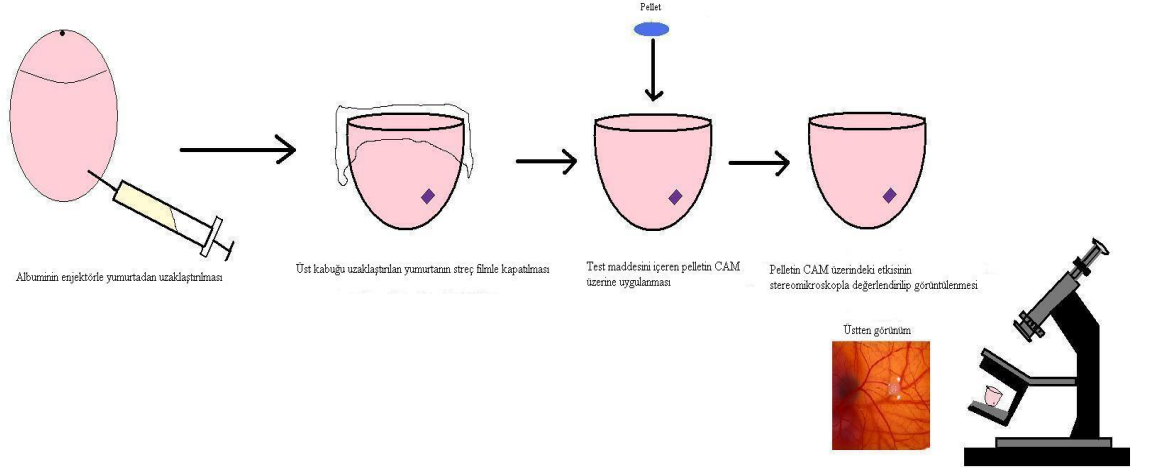
Pozitif standart kontrol madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) (2 mg.mL^{-1}), HP metanol ekstresi (1 ve 2 mg.mL^{-1}) ve negatif kontrol Hidrokortizon (2 mg.mL^{-1}); SDS ile birlikte veya olmaksızın ısıtılarak ($60 \text{ }^\circ\text{C} <$), $1 \text{ mL } \%2.5$ (*a/h*) agaroz çözeltisi içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. Sonrasında bu süspansiyondan $10 \text{ } \mu\text{L}$ alınıp 5 mm çapında paslanmaz çelik silindir desteklere uygulanarak, oda sıcaklığında donarak pellet halini almaları sağlanmış ve CAM yüzeyine uygulanmıştır. HP ekstresini içeren jel ve boş formülasyonları (1 mg.mL^{-1})'ndan $10 \text{ } \mu\text{L}$ ve $20 \text{ } \mu\text{L}$ CAM yüzeyine uygulanmıştır.

4.3.2.2. HET-CAM Deneyinin Yapılışı

Deneyde kullanılacak kuluçkalık civciv yumurtaları deneyden önce $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve $\%80$ rölatif neme sahip bir inkübatörde (iklimlendirme kabini) yatay pozisyonda 72 saat inkübe edilmiştir. Bu zaman içerisinde yumurtalar belirli aralıklarla dikkatlice çevrilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda öncelikle steril enjektörler yardımıyla yumurtaların alt kısmından yavaş bir şekilde $10-15 \text{ mL}$ albumin (yumurta akı), sonrasında yumurtaların üst kısmındaki (daha dik ve sivri olan kısım) kabuk ve zar, pens yardımıyla özenle uzaklaştırılmıştır. Canlı ve gelişmekte olan embriyo CAM hemen bir streç film ile korumaya alınıp, yine $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve $\%80$ rölatif neme sahip inkübatörde 72 saat daha bekletilmiştir. CAM çapı yaklaşık 2 cm 'ye ulaştığı görüldüğü zaman, taze hazırlanmış numune pelleti her yumurtaya bir adet olmak üzere CAM'ın üzerindeki kapilerlere yerleştirilmiştir. Her bir maddeden $15-20$ adet pellet eşit sayıda yumurtalardaki CAM üzerine uygulanıp, streç film ile kapatılmıştır. Değerlendirmeler yapılmadan önce, belirtilen koşullarda pellet yerleştirilmiş halde yumurtalar 24 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda madde içeren pelletin kapilerler üzerindeki etkileri stereo mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir. Bu deneyin yapılışı şematik olarak Şekil 4.1.'de sunulmuştur. Standart kontrol maddeleri için 10 , her test maddesi için $10-15$ adet yumurta kullanılmıştır. Standart pozitif kontrol maddesi olarak iritan madde SDS, negatif kontrol olarak ise antiinflamatuvar ilaç hidrokortizon ve kör olarak da agaroz kullanılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi, membran irritasyonu inhibisyonu dikkate alınarak stereomikroskop altında yapılmış ve CAM üzerindeki antiinflamatuvar etki görüntüleri kaydedilmiştir. Antiinflamatuvar aktivite, yani pozitif etki, SDS ile membranda oluşturulan tahrişin azalması ve damarlanma ağ dokusunun stereomikroskopta normal bir

görüntü vermesiyle belirlenmiştir. Tüm deneyler aynı şartlarda en az üç kez tekrarlanmış ve pozitif etki ortalamaları % inhibisyon olarak hesaplanmıştır (Öztürk ve Kıyan, 2020).



Şekil 4.1. HET-CAM deneyinin yapılışı.

4.3.2.3. HET-CAM Deneyinin sonuçlarının değerlendirilmesi

Test maddelerinin CAM üzerindeki antiinflamatuvar etkileri Tablo 4.3.'de verilen skor sistemine göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar, Tablo 4.4.'de yer alan yüzde inhibisyon değerlerine göre hesaplanarak verilmiştir (Öztürk ve Kıyan, 2020). Her deney, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlandıktan sonra, elde edilen verilerle istatistiksel analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ortalama \pm SH olarak verilmiştir. Kontrol grubu ve deney grupları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı GraphPad 7.0 yazılımı ile tek yönlü ANOVA analizi ve Tukey post-hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.3. CAM üzerindeki antiinflamatuvar etkinin değerlendirilmesinde kullanılan skor sistemi

Skor	Etki	Açıklama
1	İritasyon	Kuvvetlice damarlanmış granuloma mevcut. Kapilerler granulomanın etrafında yıldız biçiminde ağ oluşturmuş.
2	Zayıf iritasyon	Granuloma zayıf bir şekilde damarlanmış.
3	Zayıf-normal	Granulomanın etrafında yıldız biçiminde zayıf bir kapiler ağ mevcut. Granuloma skor 1 ve 2'ye göre daha küçük ve sadece zayıf bir damarlanma mevcut.
4	Normal damar oluşumu	Fark edilmesi zor yıldız biçiminde damar ağı mevcut. Granuloma veya iz yok. Damarlanma normal olarak gerçekleşmiş.

Tablo 4.4. HET-CAM yönteminde değerlendirmede kullanılan inhibisyon skalası

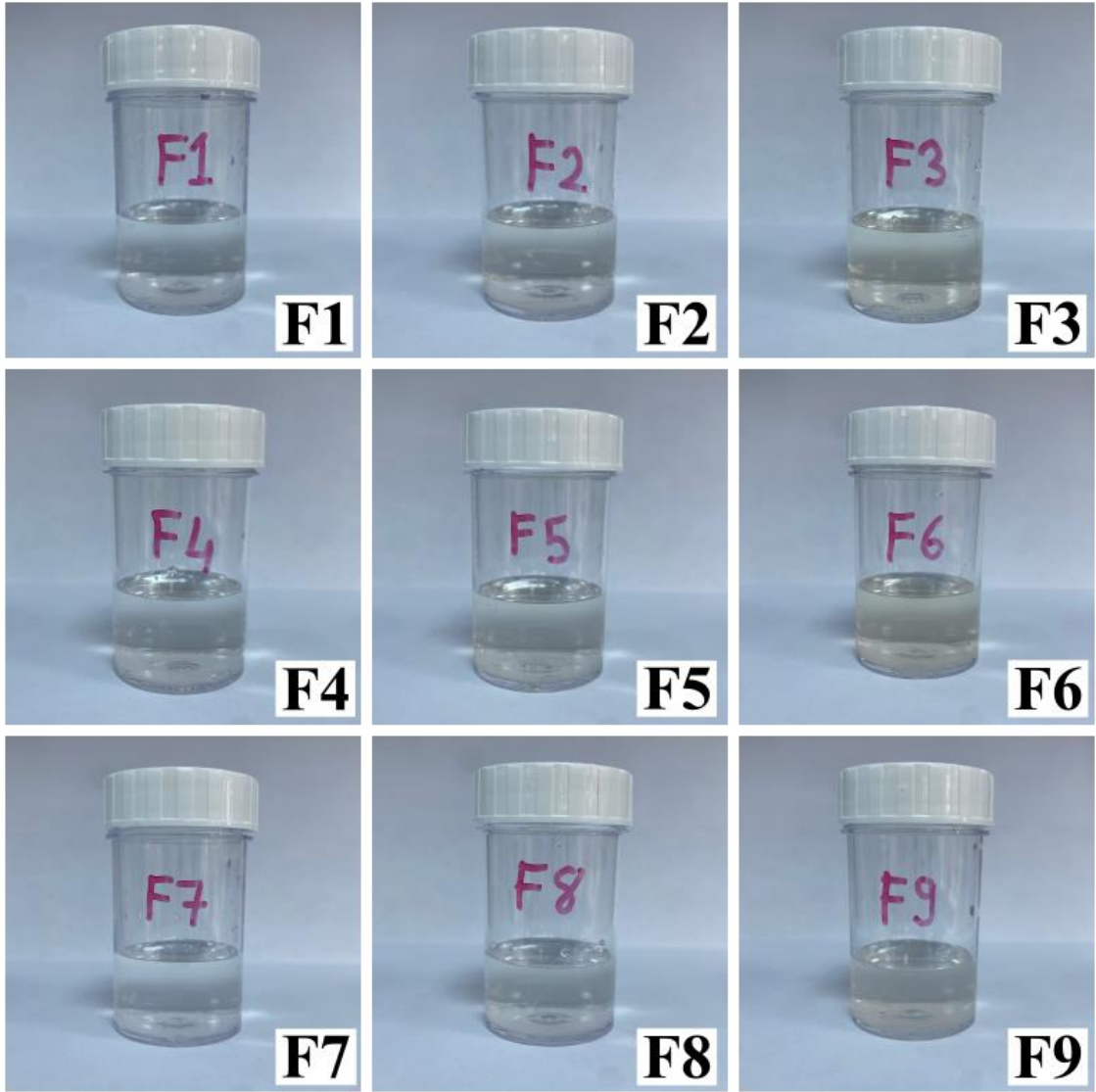
İnhibisyon (%)	Etki
≤ 40	Antiinflamatuvar aktivite yok
40-55	Çok zayıf antiinflamatuvar etki
55-70	Zayıf antiinflamatuvar etki
70-85	Kuvvetli antiinflamatuvar etki
> 85	Çok kuvvetli antiinflamatuvar etki

5. BULGULAR

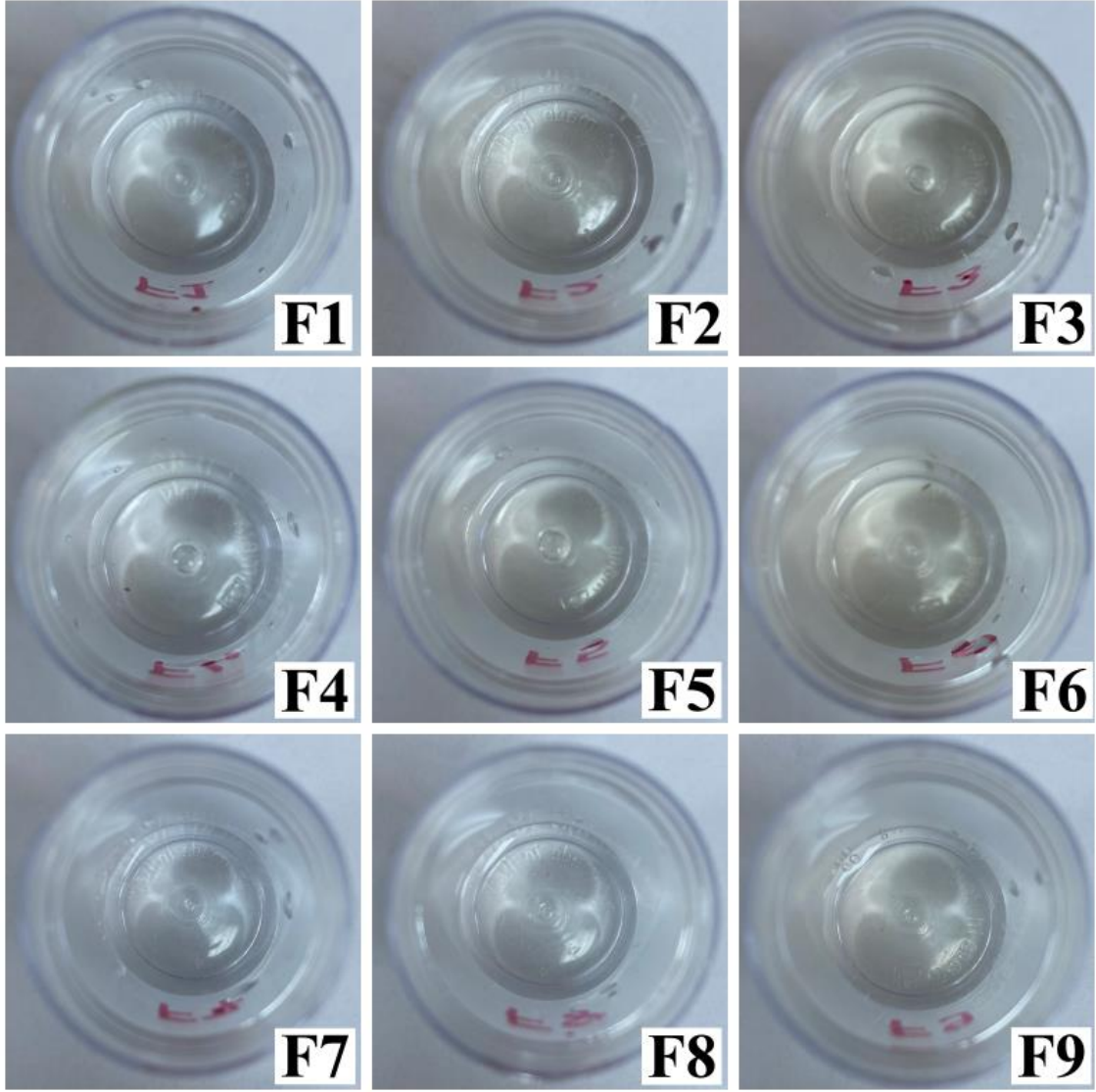
5.1. Formülasyonların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

5.1.1. Formülasyonların fiziksel görünüşünün değerlendirilmesi

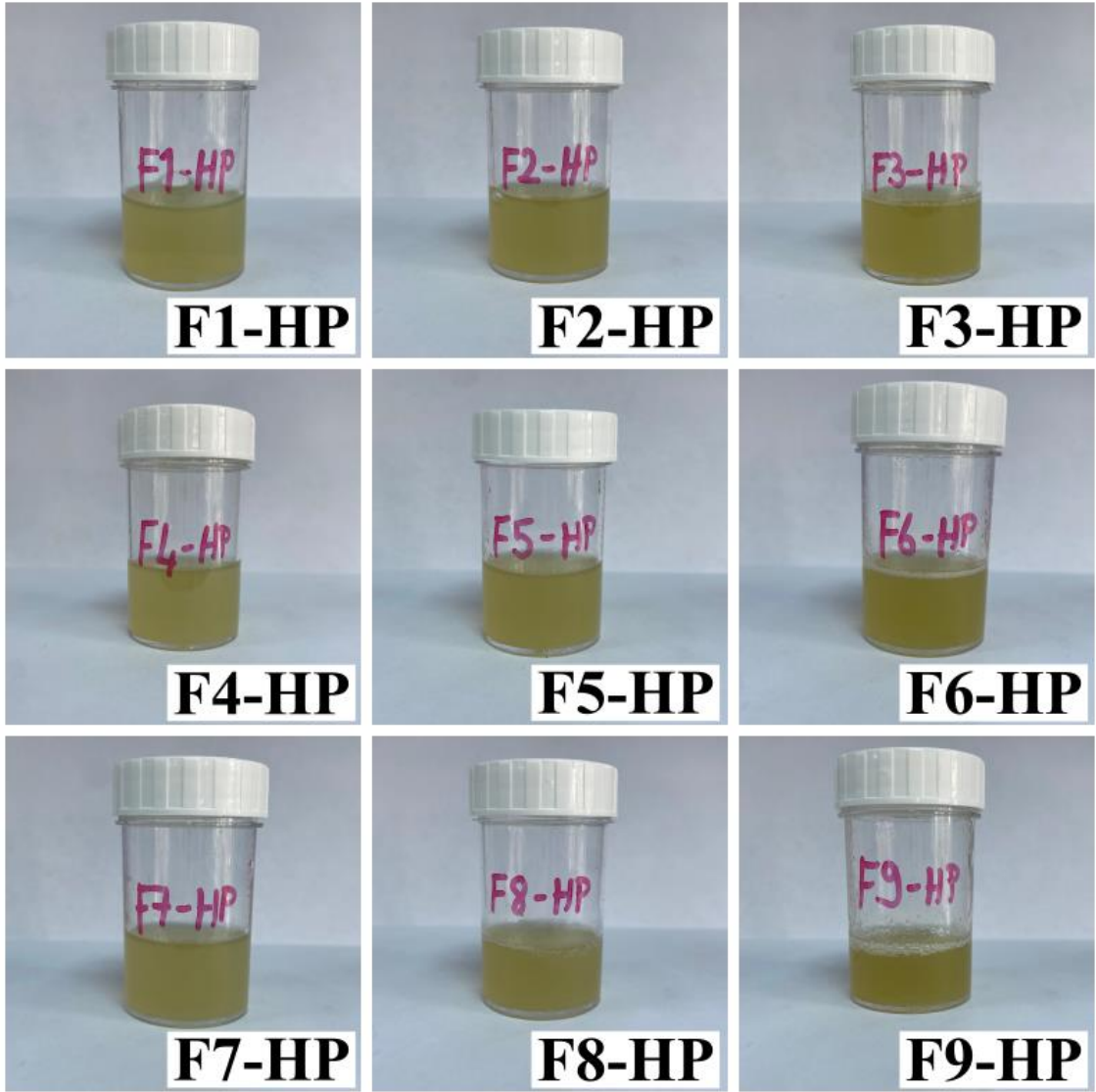
‘4.1. Formülasyonların hazırlanması’ bölümünde belirtildiği şekilde hazırlanan ve optimize edilen jellerin görüntüleri boş jeller için Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.; HP içeren jeller için ise Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.’te sunulmuştur.



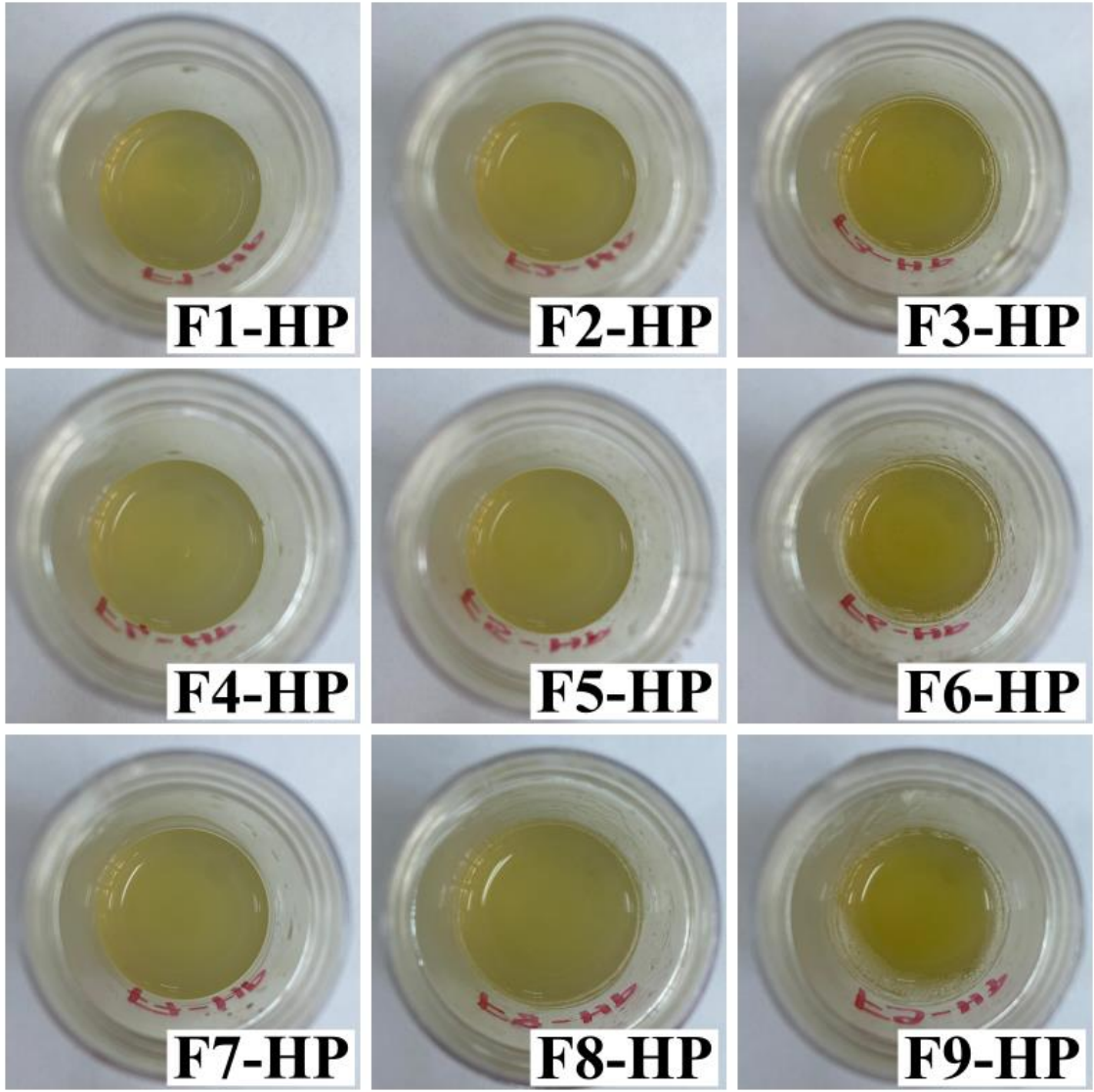
Şekil 5.1. Hazırlanan boş formülasyonların görüntüleri



Şekil 5.2. Hazırlanan boş formülasyonların üstten görüntüleri



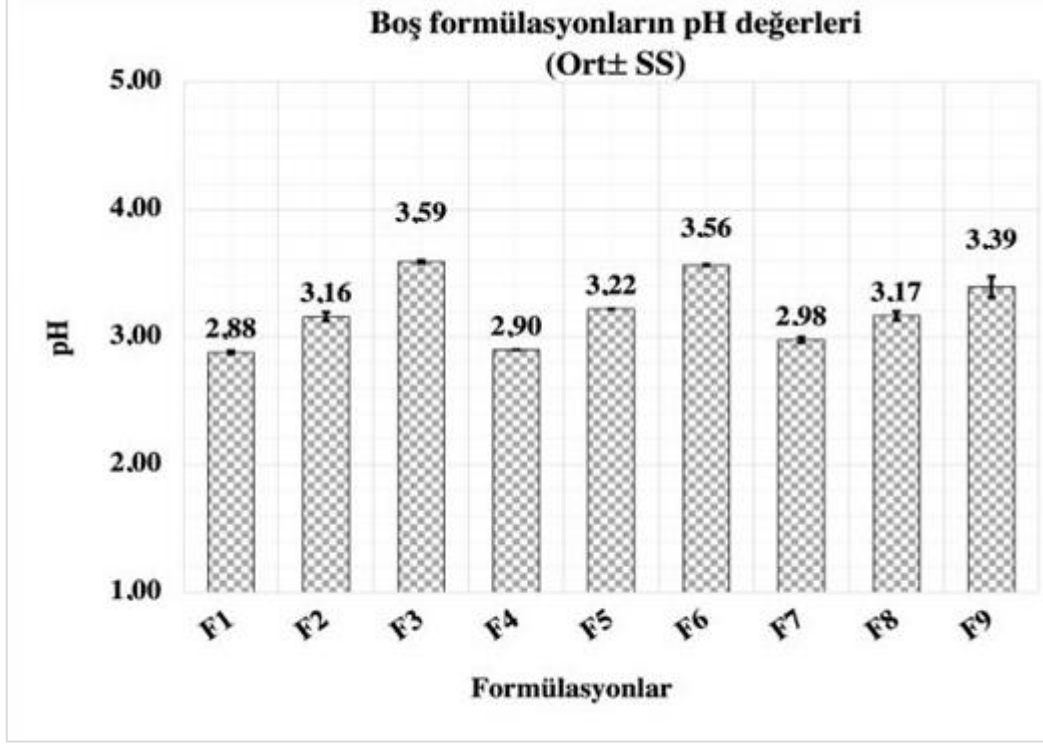
Şekil 5.3. Hazırlanan HP içeren formülasyonların görüntüleri



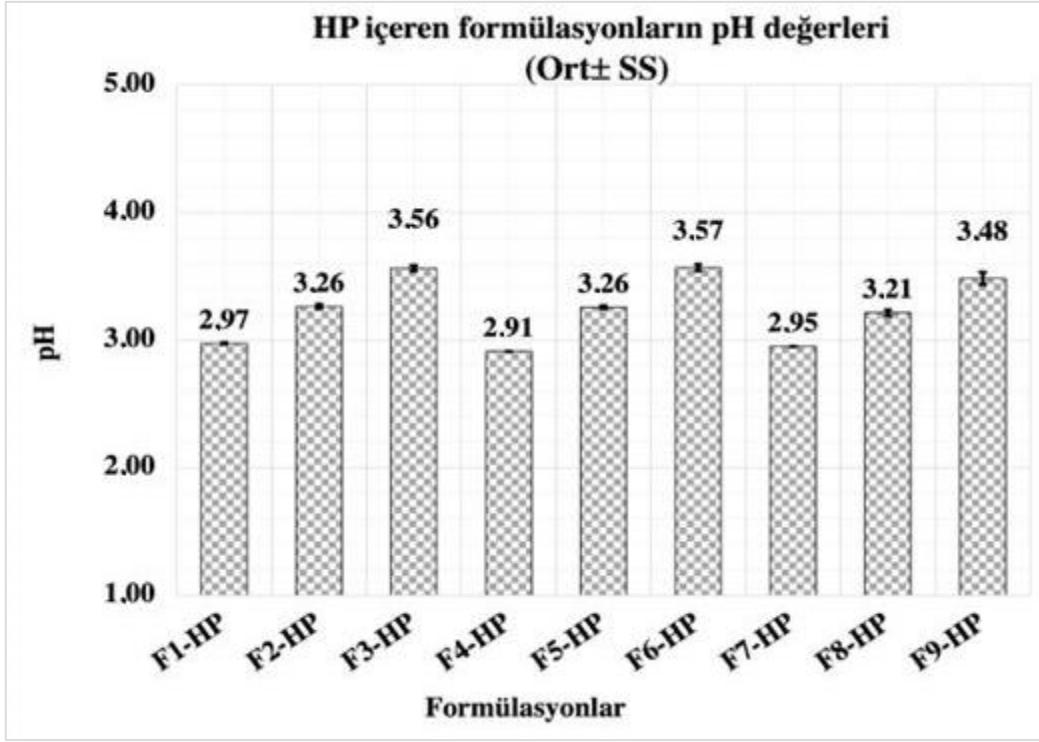
Şekil 5.4. Hazırlanan HP içeren formülasyonların üstten görüntüleri

5.1.2. Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi

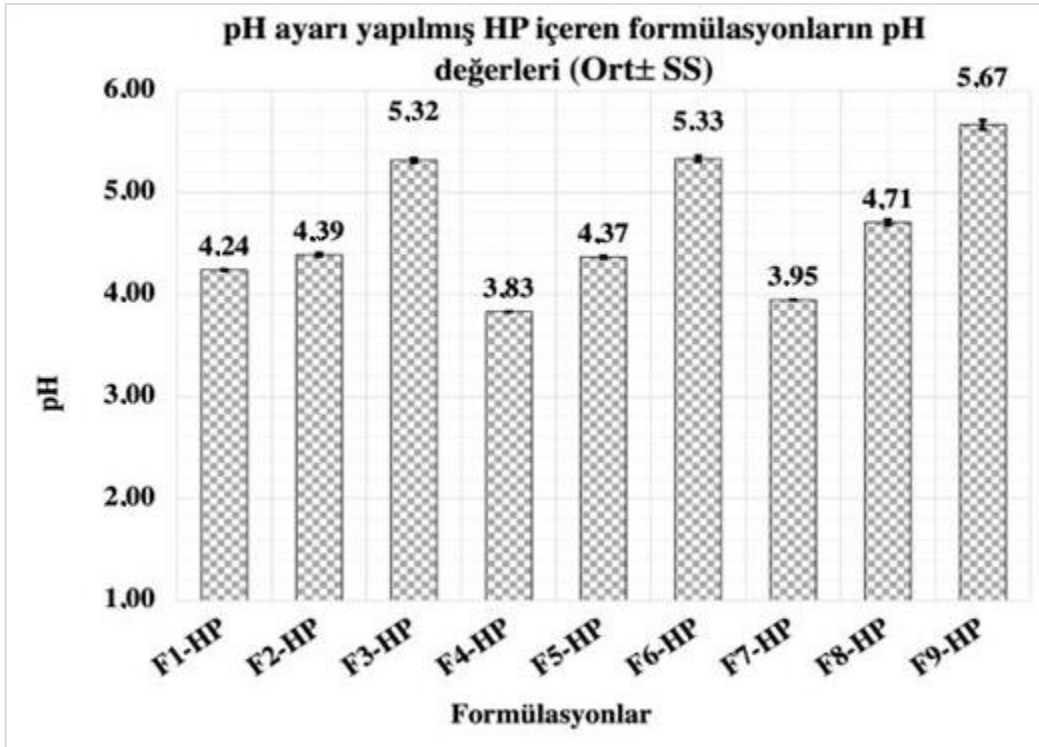
Boş formülasyonların, HP içeren formülasyonların ve pH ayarı yapılmış HP içeren formülasyonların pH değerleri sırasıyla Şekil 5.5., Şekil 5.6. ve Şekil 5.7.'de sunulmuştur.



Şekil 5.5. Boş formülasyonlara ait pH değerleri



Şekil 5.6. HP içeren formülasyonlara ait pH değerleri



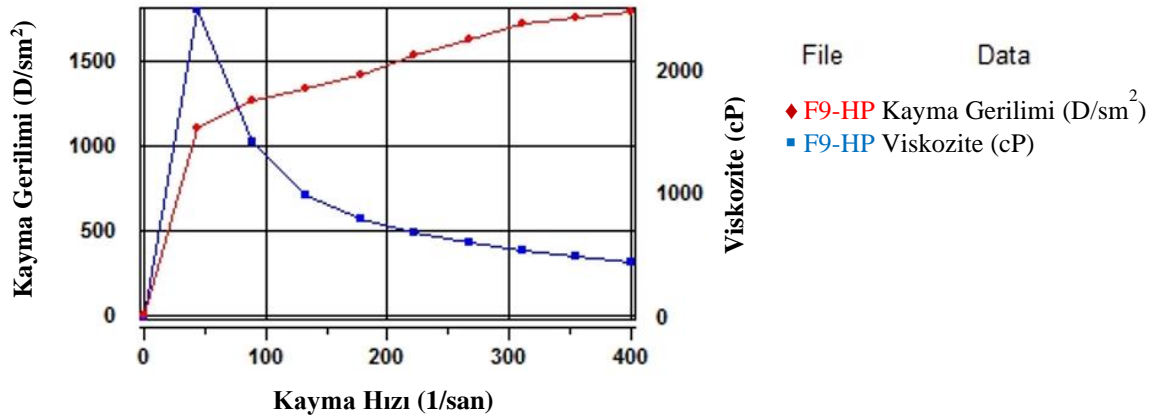
Şekil 5.7. pH ayarı yapılmış HP içeren formülasyonlara ait pH değerleri

5.1.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi

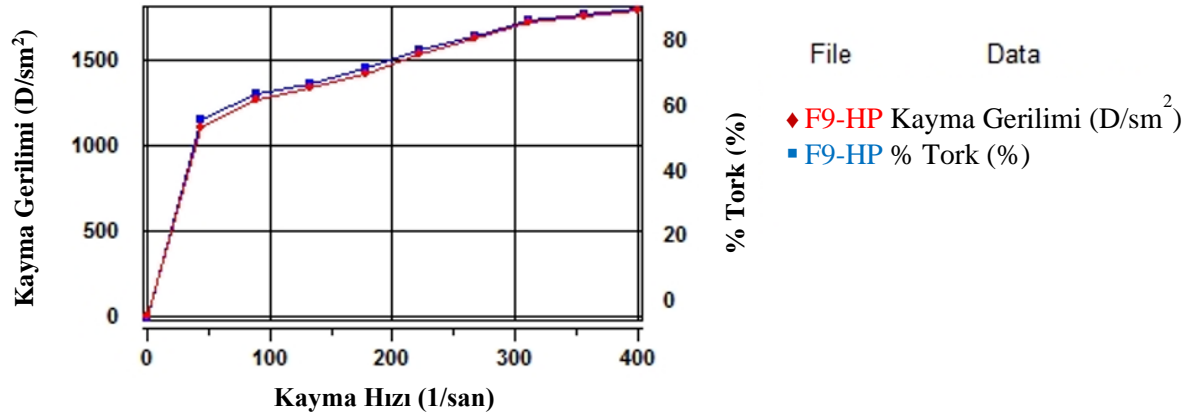
Optimum formülasyon olan F9-HP'nin reolojik davranışı ve modellere uygunluk değerlendirmesi üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

5.1.3.1 Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi (Ölçüm 1)

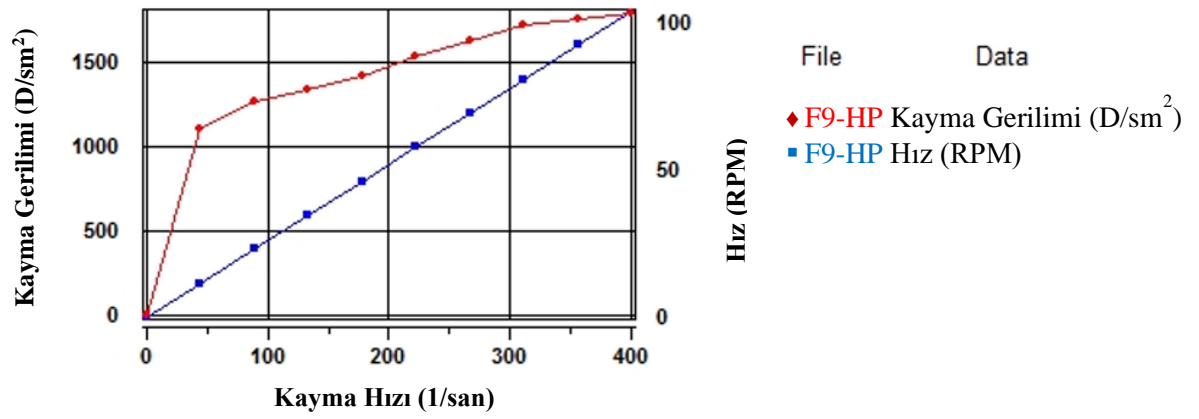
F9-HP kodlu formülün kayma gerilimi (D/cm^2 , y eksenine) karşı kayma hızının ($1/saniye$, x eksenine) belirlendiği Ölçüm 1'in sonuçları viskozite (cP), tork (%) ve hız (RPM) için sırasıyla Şekil 5.8., Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.'da sunulmuştur. F9-HP kodlu formülün ölçüm 1 için akış modellerine uygunluğu Bingham, Casson ve Power Law için CoF değerleri ile sırasıyla Şekil 5.11., Şekil 5.12. ve Şekil 5.13.'te sunulmuştur.



Şekil 5.8. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için reogramı (viskozite)



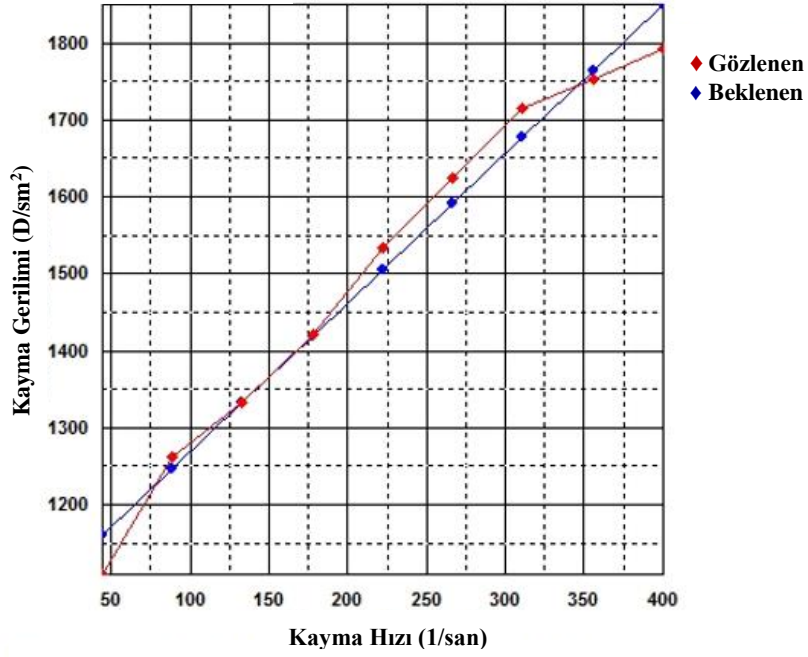
Şekil 5.9. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için reogramı (tork)



Şekil 5.10. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için reogramı (hız)

Analiz Grafiği: Bingham

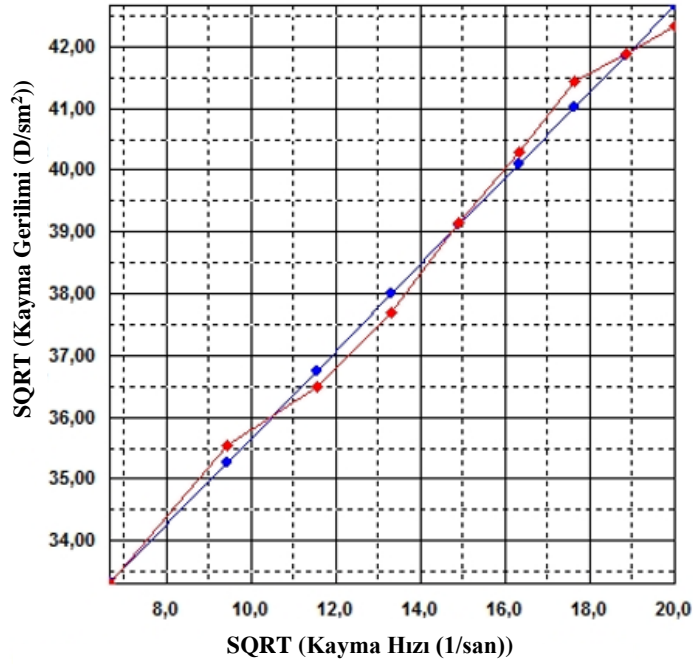
Dosya: F9-HP



Şekil 5.11. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için Bingham Modele uygunluk grafiği

Analiz Grafiği: Casson

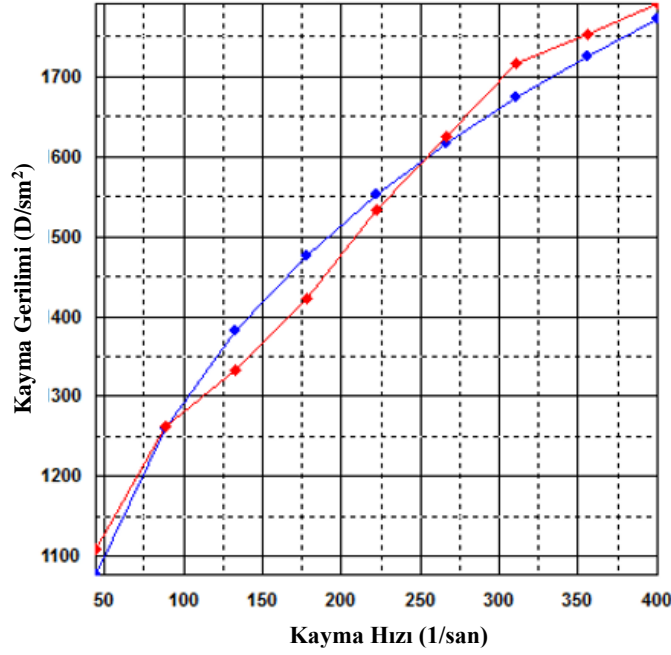
Dosya: F9-HP



Şekil 5.12. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için Casson Modele uygunluk grafiği

Analiz Grafiği: Power Law

Dosya: F9-HP

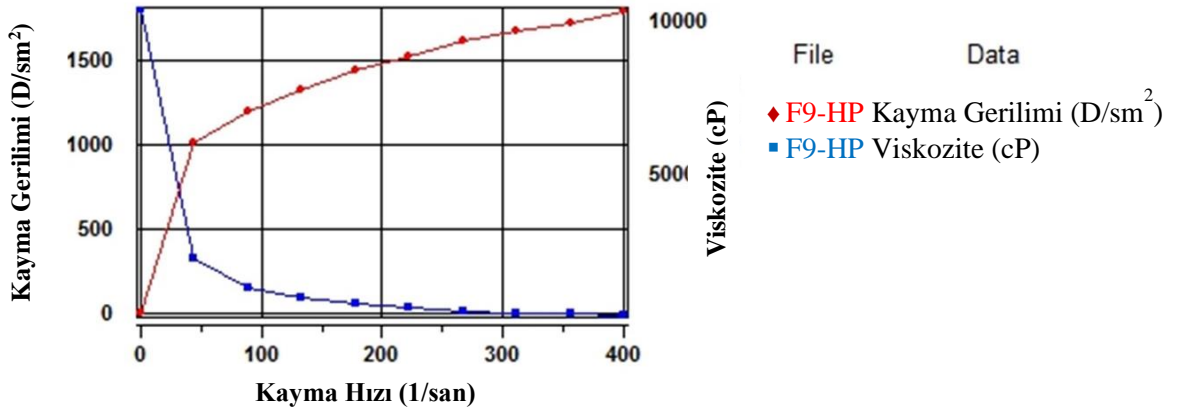


Tutarlılık İndeksi = 45522 Akış İndeksi = 0.23 CoF = 98.1

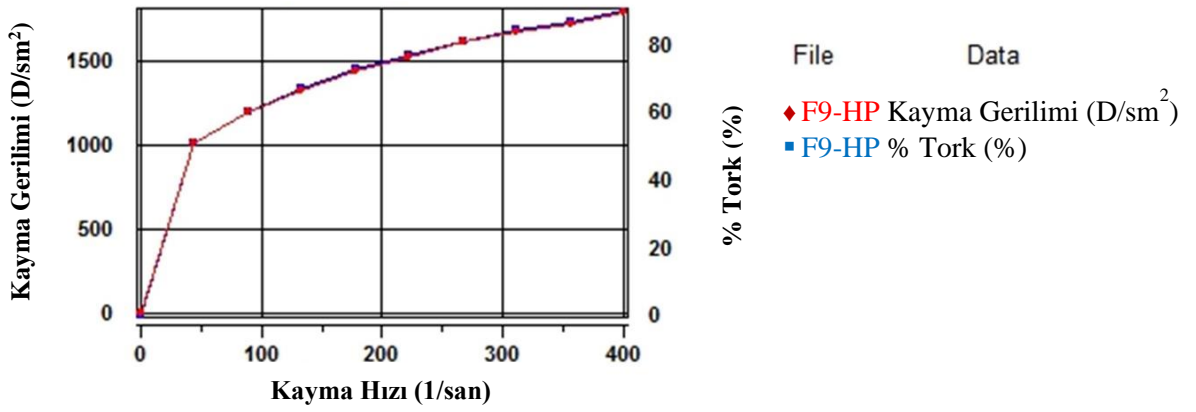
Şekil 5.13. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 1 için Power Law Modele uygunluk grafiği

5.1.3.2. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi (Ölçüm 2)

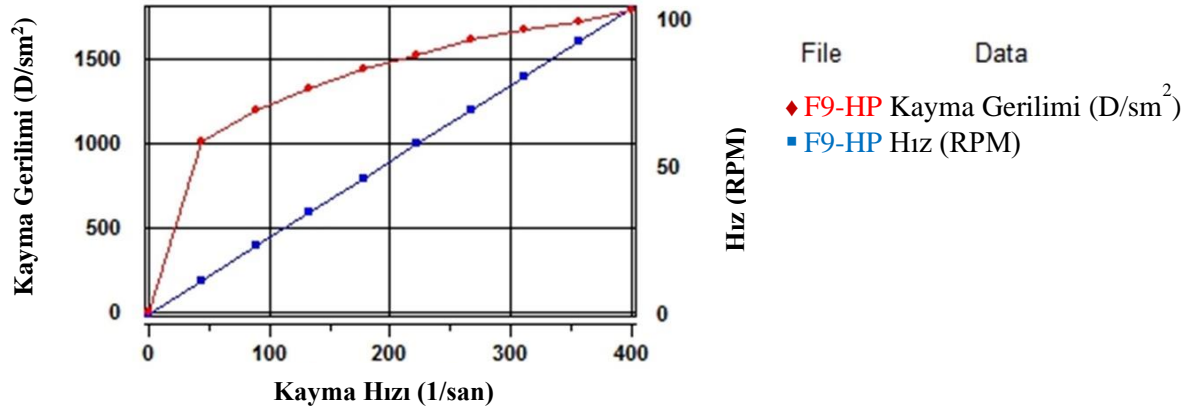
F9-HP kodlu formülün kayma gerilimi (D/cm^2 , y eksenine) ne karşı kayma hızının ($1/saniye$, x eksenine) belirlendiği Ölçüm 2'nin sonuçları viskozite (cP), tork (%) ve hız (RPM) için sırasıyla Şekil 5.14., Şekil 5.15. ve Şekil 5.16.'da sunulmuştur. F9-HP kodlu formülün ölçüm 2 için akış modellerine uygunluğu Bingham, Casson ve Power Law modelleri için CoF değerleri ile sırasıyla Şekil 5.17., Şekil 5.18. ve Şekil 5.19.'da sunulmuştur.



Şekil 5.14. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için reogramı (viskozite)

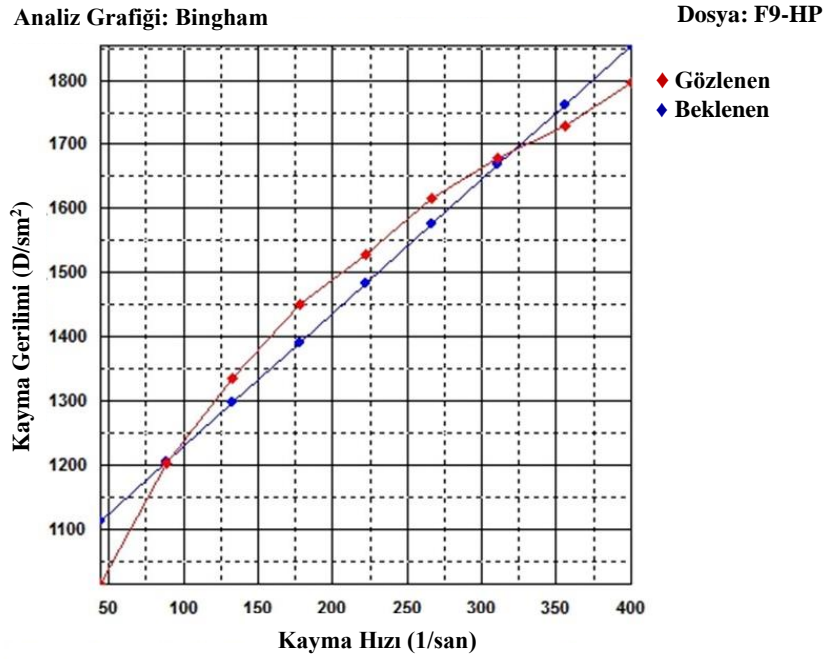


Şekil 5.15. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için reogramı (tork)



Şekil 5.16. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için reogramı (hız)

**Shear stress*: Kayma gerilimi, *Shear rate*: Kayma hızı, *Speed*: Hız

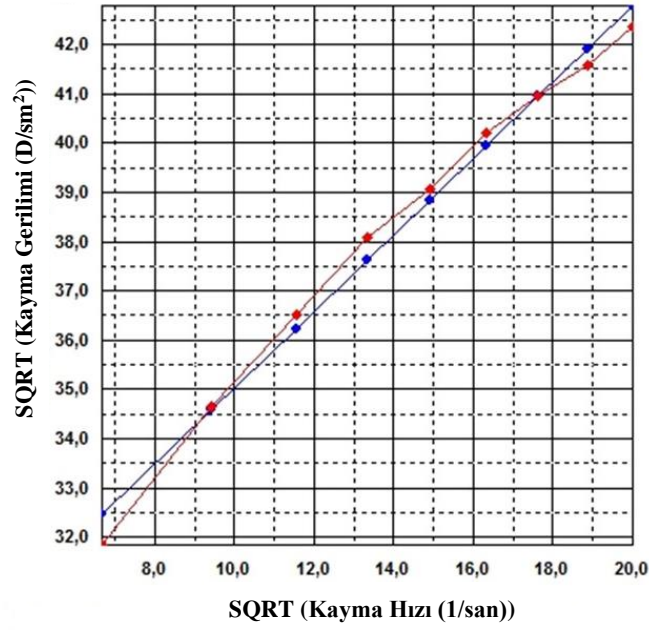


Plastik Viskozite = 208.7 Akış Gerilimi = 1019 CoF = 96.9

Şekil 5.17. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için Bingham Modele uygunluk grafiği

Analiz Grafiği: Casson

Dosya: F9-HP

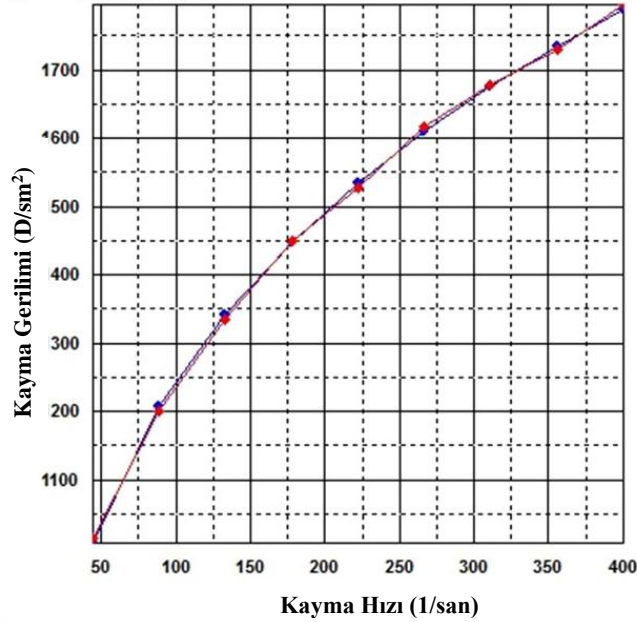


Plastik Viskozite = 60.1 Akış Gerilimi = 744.2 CoF = 99.2

Şekil 5.18. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için Casson Modele uygunluk grafiği

Analiz Grafiği: Power Law

Dosya: F9-HP

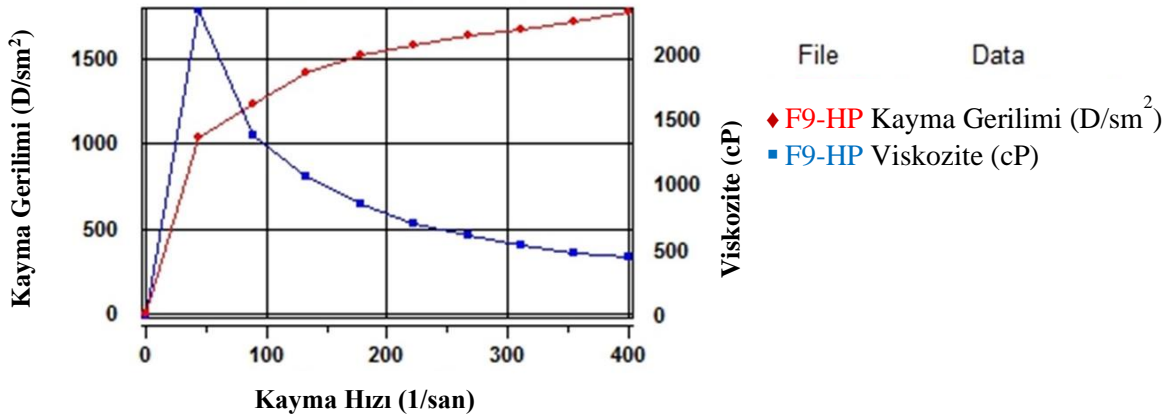


Tutarlılık İndeksi = 37394 Akış İndeksi = 0.26 CoF = 99.6

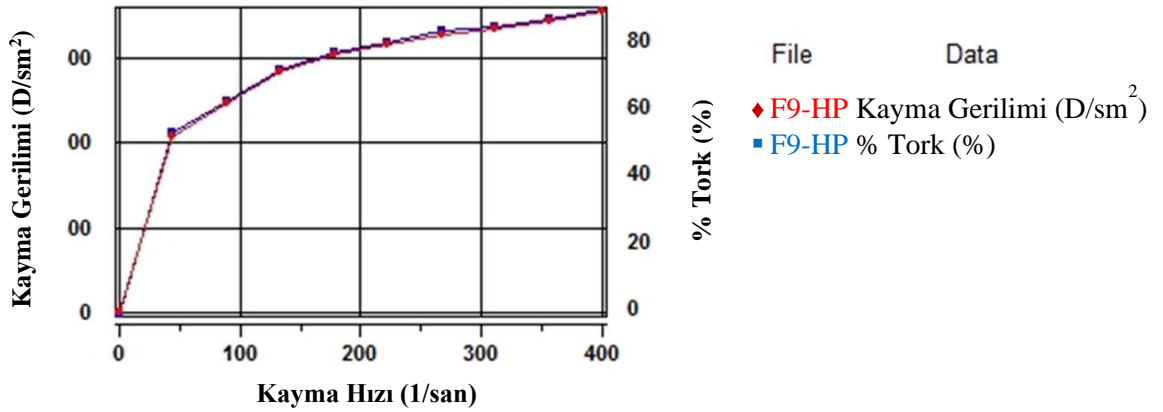
Şekil 5.19. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 2 için Power Law Modele uygunluk grafiği

5.1.3.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi (Ölçüm 3)

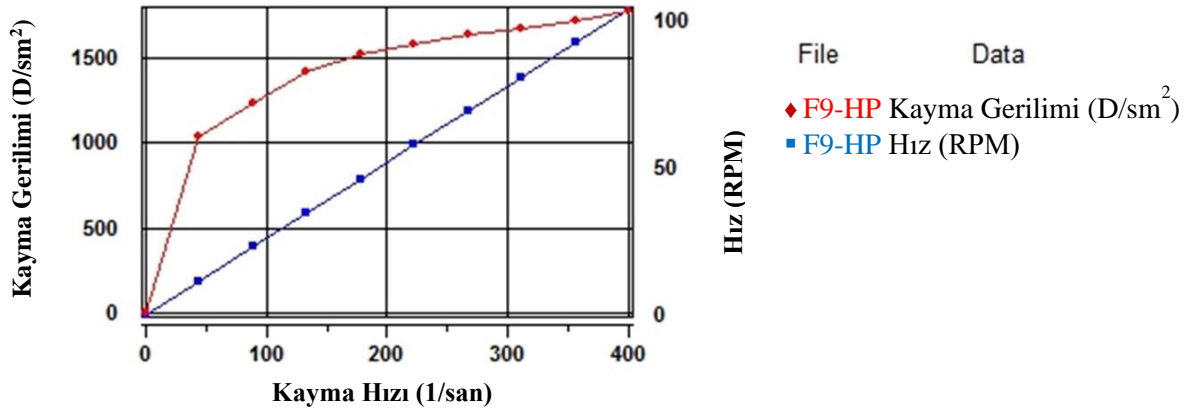
F9-HP kodlu formülün kayma gerilimi (D/cm^2 , y eksenine) karşı kayma hızının ($1/saniye$, x eksenine) belirlendiği Ölçüm 3'ün sonuçları viskozite (cP), tork (%) ve hız (RPM) için sırasıyla Şekil 5.20., Şekil 5.21. ve Şekil 5.22.'de sunulmuştur. F9-HP kodlu formülün ölçüm 3 için akış modellerine uygunluğu Bingham, Casson ve Power Law modelleri için CoF değerleri ile sırasıyla Şekil 5.23., Şekil 5.24. ve Şekil 5.25.'te sunulmuştur.



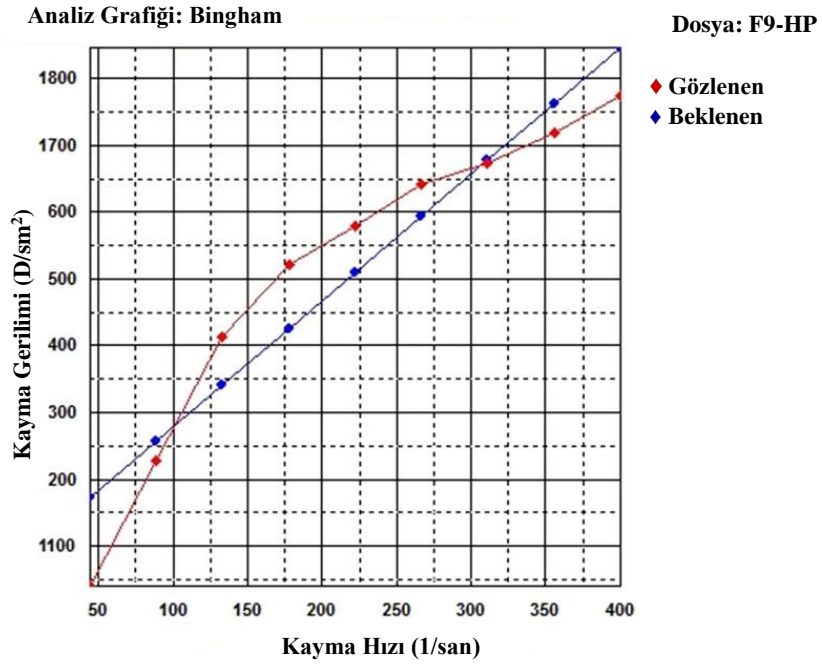
Şekil 5.20. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için reogramı (viskozite)



Şekil 5.21. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için reogramı (tork)



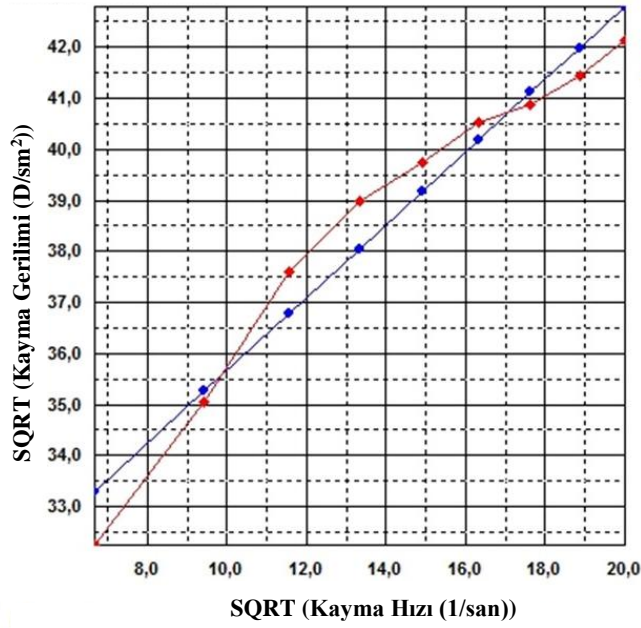
Şekil 5.22. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için reogramı (hız)



Plastik Viskozite = 189.3 Akış Gerilimi = 1089 CoF = 95.5

Şekil 5.23. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için Bingham Modele uygunluk grafiği

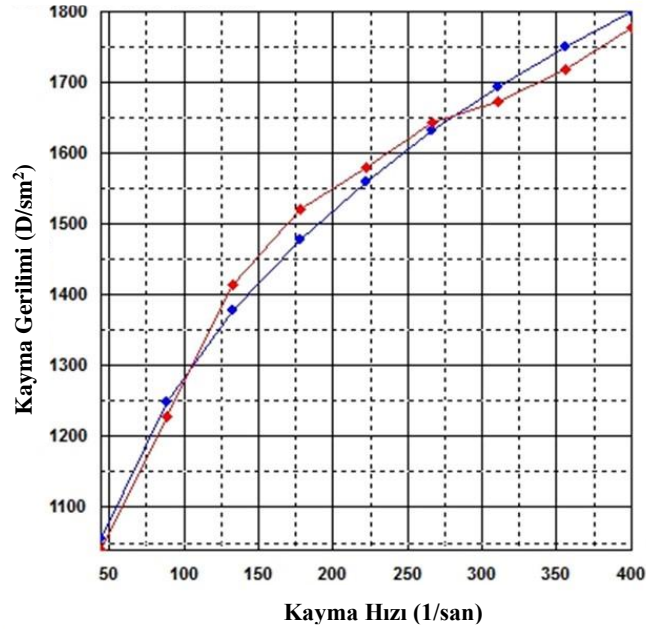
Analiz Grafiği: Casson



Plastik Viskozite = 50.7 Akış Gerilimi = 815.2 CoF = 98.4

Şekil 5.24. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için Casson Modele uygunluk grafiği

Analiz Grafiği: Power Law



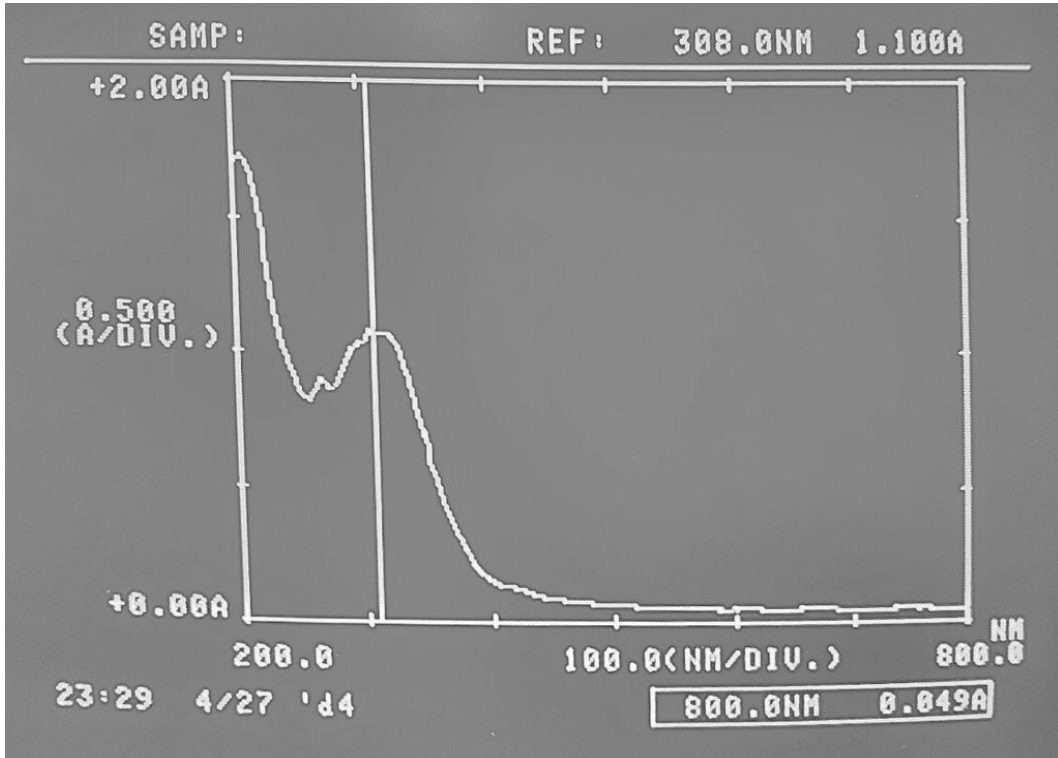
Tutarlılık İndeksi = 41991 Akış İndeksi = 0.24 CoF = 98.4

Şekil 5.25. F9-HP kodlu formülasyonun ölçüm 3 için Power Law Modele uygunluk grafiği

5.1.4. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresinin analitik validasyon çalışması

5.1.4.1. Absorbans belirleme

100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda hazırlanmış olan HP, 308 nm'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiştir (Bkz. Şekil 5.26.)



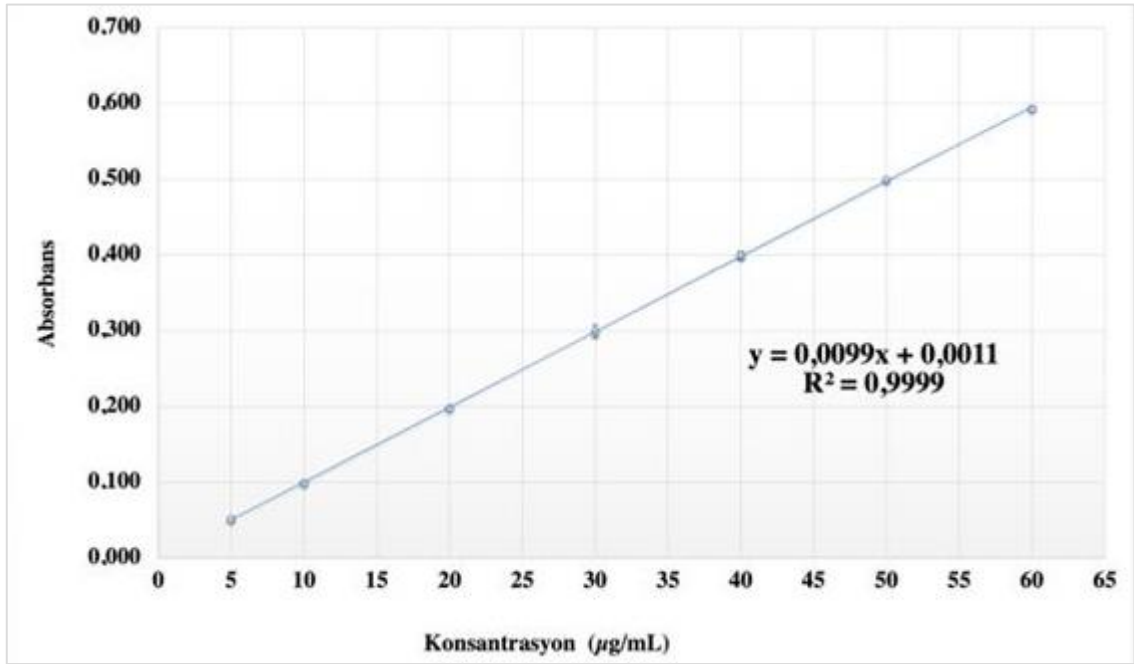
Şekil 5.26. HP'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 308.0$ nm)

5.1.4.2. Doğrusallık

HP'nin pH 5.5 PBS içinde 5.0-60.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonları aralığında yedi farklı kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri Tablo 5.1.'de sunulmuştur. Absorbans değerleri kullanılmakla kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait olan doğru denklemi Şekil 5.27.'de sunulmuştur.

Tablo 5.1. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ve absorbans değerleri

HP (µg/mL)	Absorbans Değerleri			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
5.00	0.047	0.053	0.053	0.051
10.00	0.098	0.100	0.100	0.099
20.00	0.196	0.198	0.200	0.198
30.00	0.289	0.304	0.304	0.299
40.00	0.393	0.403	0.401	0.399
50.00	0.497	0.499	0.501	0.499
60.00	0.592	0.597	0.590	0.593



Şekil 5.27. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresine ait standart eğri

5.1.4.3. Kesinlik

HP'nin $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için 3 tekrar analizi, 3 gün artarda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları Tablo 5.2., Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.'te sunulmuştur.

Tablo 5.2. $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon için kesinlik sonuçları

25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	1. Gün	2. Gün	3. gün
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.249	0.249	0.249
	0.246	0.246	0.249
	0.247	0.247	0.248
	1.Gün	2. Gün	3. gün
	(Konsantrasyon)	(Konsantrasyon)	(Konsantrasyon)
	25.016	25.016	25.016
	24.714	24.714	25.016
	24.814	24.814	24.915
Ortalama	24.848	24.848	24.983
Standart sapma	0.154	0.154	0.058
Varyasyon Katsayısı (%)	0.620	0.620	0.233
%95 Güven Aralığı	0.383	0.383	0.145

Tablo 5.3. $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon için kesinlik sonuçları

35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	1. Gün	2. Gün	3. gün
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.347	0.351	0.348
	0.348	0.347	0.345
	0.350	0.339	0.342
	1.Gün	2. Gün	3. gün
	(Konsantrasyon)	(Konsantrasyon)	(Konsantrasyon)
	34.904	35.307	35.005
	35.005	34.904	34.702
	35.206	34.097	34.399
Ortalama	35.038	34.769	34.702
Standart sapma	0.154	0.616	0.303
Varyasyon Katsayısı (%)	0.440	1.773	0.872
%95 Güven Aralığı	0.383	1.531	0.752

Tablo 5.4. 45 µg.mL⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları

45 µg.mL ⁻¹			
	1. Gün (Absorbans)	2. Gün (Absorbans)	3. gün (Absorbans)
	0.446	0.449	0.448
	0.448	0.444	0.448
	0.444	0.449	0.446
	1.Gün (Konsantrasyon)	2. Gün (Konsantrasyon)	3. gün (Konsantrasyon)
	44.892	45.195	45.094
	45.094	44.690	45.094
	44.690	45.195	44.892
Ortalama	44.892	45.027	45.027
Standart sapma	0.202	0.291	0.117
Varyasyon Katsayısı (%)	0.449	0.647	0.259
%95 Güven Aralığı	0.501	0.724	0.289

5.1.4.4. Doğruluk

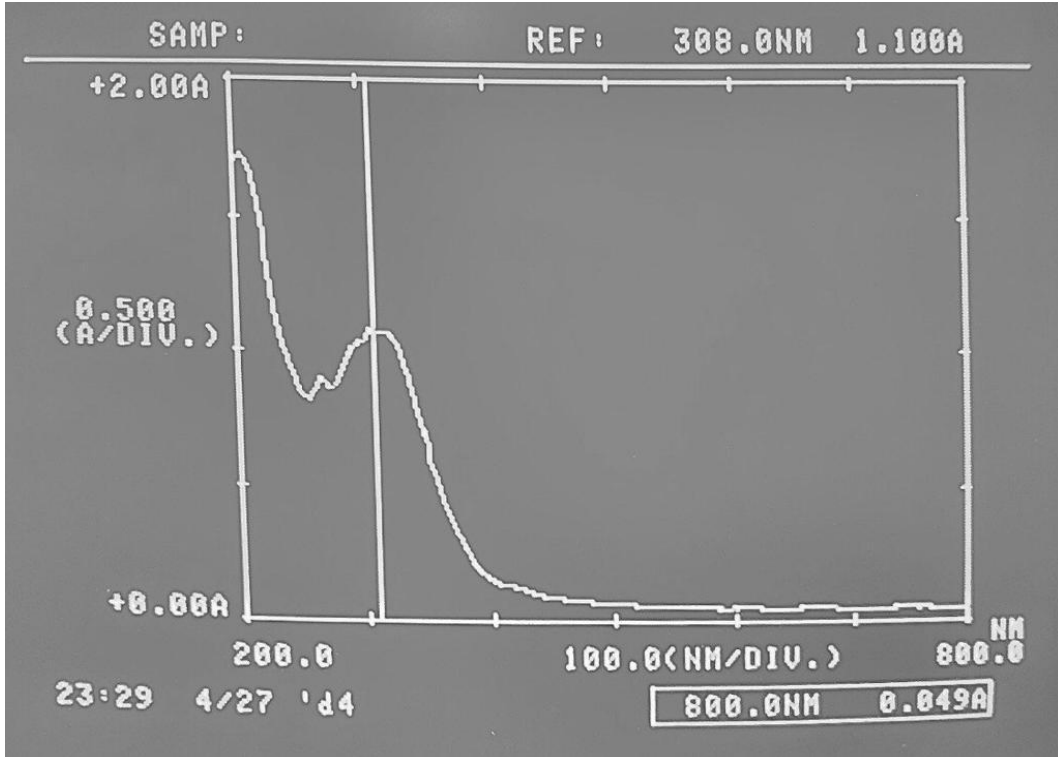
Doğruluğun belirlenebilmesi amacıyla 3 farklı konsantrasyona (25 µg.mL⁻¹, 35 µg.mL⁻¹, 45 µg.mL⁻¹) HP içeren stok çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 tekrar analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve bilinen konsantrasyonlar ile karşılaştırılmış, sonrasında yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.5.’te sunulmuştur.

Tablo 5.5. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi için elde edilen doğruluk değerleri

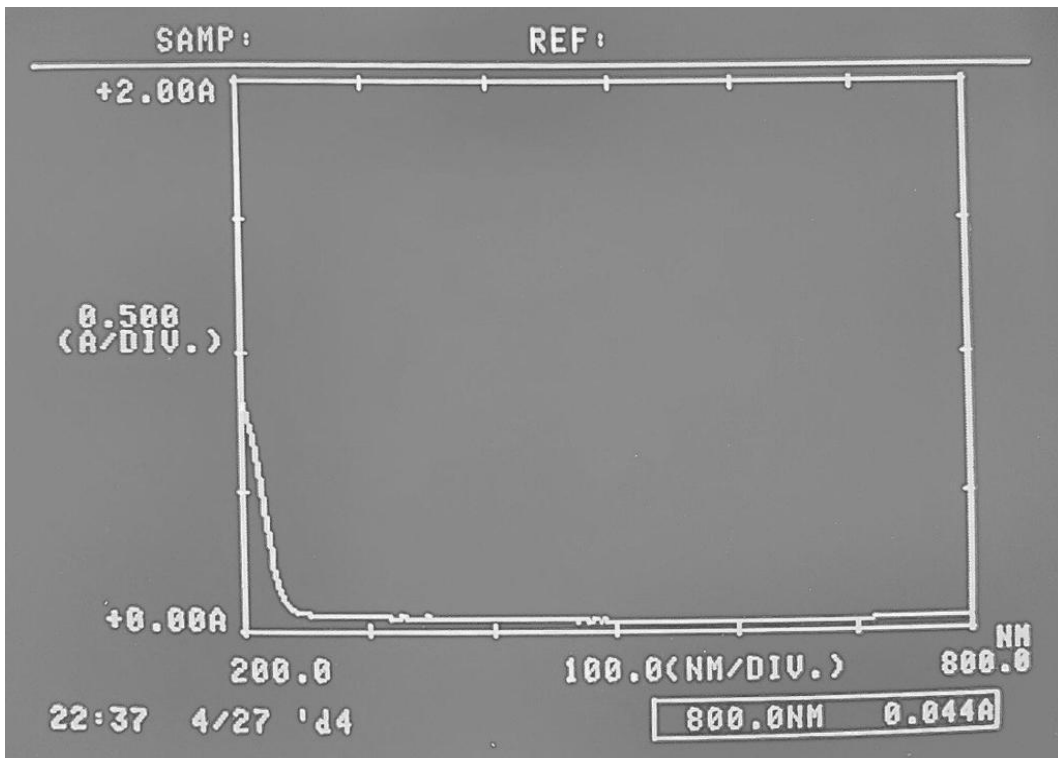
	Eklenen Konsantrasyon		
	25 µg.mL ⁻¹	35 µg.mL ⁻¹	45 µg.mL ⁻¹
Elde edilen absorpsiyonlar	0.246	0.349	0.448
	0.249	0.344	0.444
	0.247	0.347	0.445
Bulunan Konsantrasyonlar	24.714	35.106	45.094
	25.016	34.601	44.690
	24.814	34.904	44.791
% Geri Kazanım	98.854	100.302	100.209
	100.065	98.860	99.312
	99.258	99.725	99.536
Ortalama			
% Geri Kazanım	99.392	99.629	99.686
% Fark	0.608	0.371	0.314
Standart sapma	0.616	0.725	0.467
Varyasyon Katsayısı	0.620	0.728	0.468
Standart hata	0.356	0.419	0.269
%95 Güven Aralığı	1.531	1.802	1.159

5.1.5.5. Seçicilik

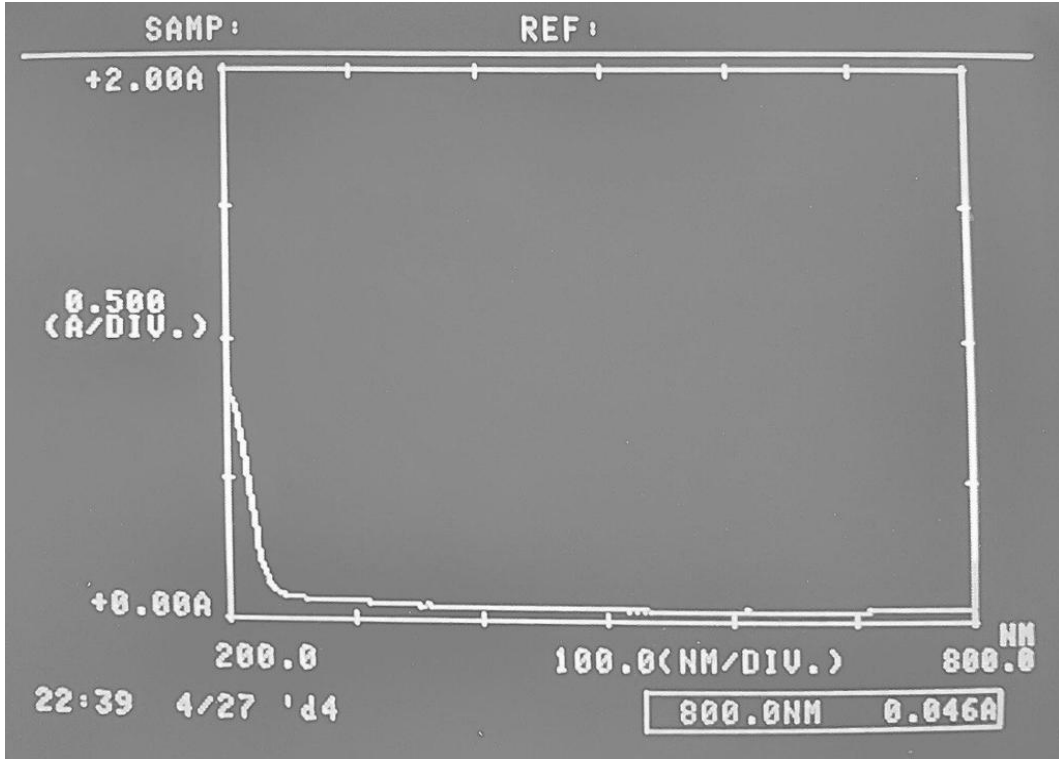
Seçicilik çalışması için elde edilen spektrumlar HP, pH 5.5 PBS ve F9 (Boş formülasyon) için sırasıyla Şekil 5.28., Şekil 5.29. ve Şekil 5.30.'da sunulmuştur.



Şekil 5.28. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresine ait spektrum



Şekil 5.29. pH 5.5 PBS'e ait spektrum



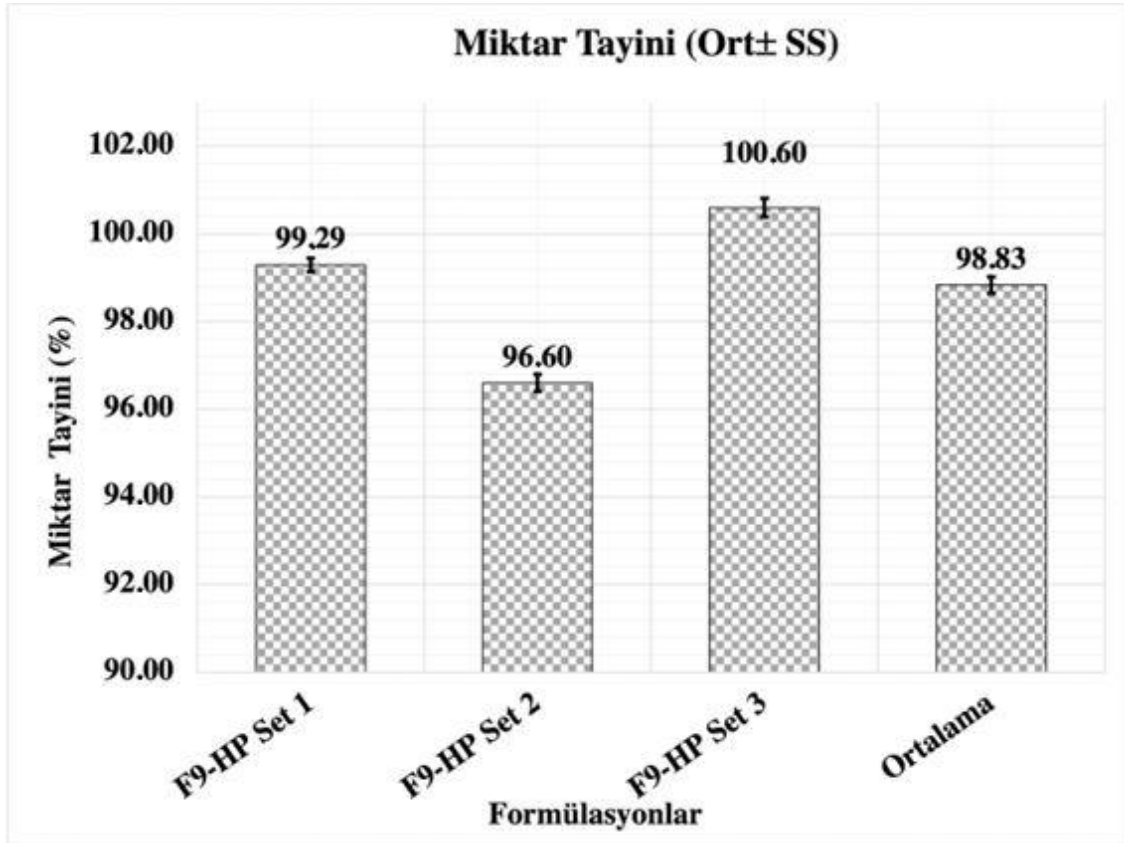
Şekil 5.30. *Helichrysum pampylicum* metanol ekstresi içermeyen formulasyona (F9) ait spektrum

5.1.5. Formülasyonlardaki *Helichrysum pampylicum* metanol ekstresi miktarının belirlenmesi

F9-HP kodlu jelde bulunan HP miktarları Tablo 5.6. ve karşılaştırma yapılabilmesi açısından Şekil 5.31.'de sunulmuştur. İlgili şeklin birinci sütununda birinci setin sonuçları, ikinci sütununda ikinci setin sonuçları, üçüncü sütununda üçüncü setin sonuçları, dördüncü sütununda ise ortalama değer bulunmaktadır.

Tablo 5.6. Miktar tayini sonuçları

	F9-HP Set 1	F9-HP Set 2	F9-HP Set 3	Ortalama
Miktar Tayini	99.29 ± 0.16	96.60 ± 0.19	100.60 ± 0.21	98.83 ± 0.19



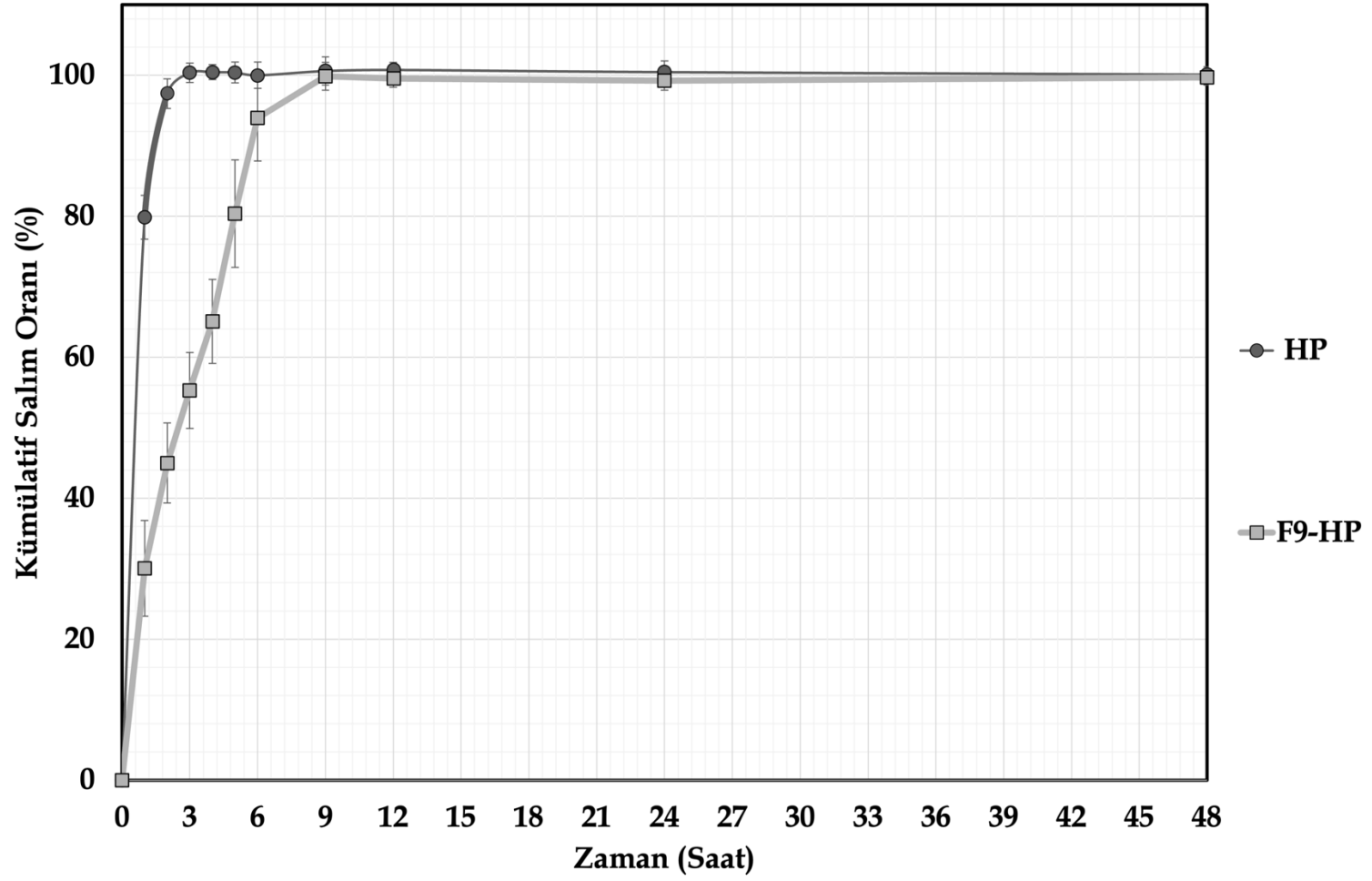
Şekil 5.31. F9-HP kodlu formülasyonun için miktar tayini sonuçları

5.1.6. *In vitro* dissolüsyon çalışması

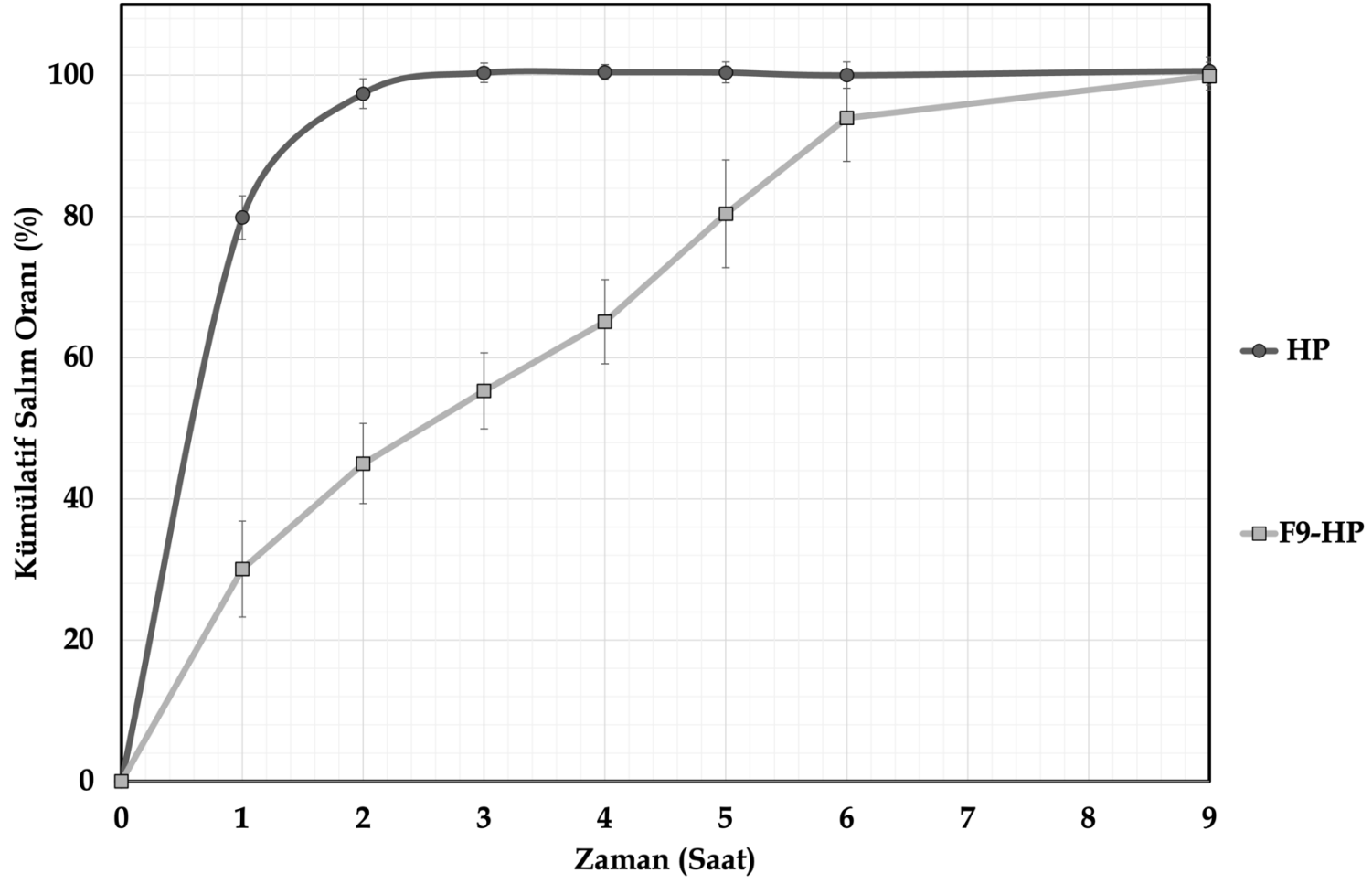
HP ve F9-HP kodlu formülasyona ait zamana karşı kümülatif çözünen HP miktarı verileri Tablo 5.7.'de verilmiştir. Elde edilen tüm veriler kullanılarak F9-HP kodlu kitosan jel formülasyonuna ait *in vitro* dissolüsyon profilleri 48 saatlik ve 9 saatlik olarak sırasıyla Şekil 5.32. ve Şekil 5.33'te sunulmuştur.

Tablo 5.7. HP ve F9-HP kodlu formülasyona ait zamana karşı kümülatif çözünen HP miktarları

Saat	HP	F9-HP
1	79.838 ± 3.095	30.033 ± 6.789
2	97.397 ± 2.086	44.985 ± 5.674
3	100.348 ± 1.373	55.278 ± 5.385
4	100.441 ± 1.059	65.077 ± 5.965
5	100.391 ± 1.488	80.367 ± 7.619
6	100.005 ± 1.860	93.939 ± 6.133
9	100.610 ± 1.992	99.867 ± 1.969
12	100.765 ± 1.057	99.534 ± 1.249
24	100.454 ± 1.558	99.241 ± 1.354
48	100.109 ± 1.074	99.713 ± 1.131



Şekil 5.32. HP ve F9-HP kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği (48 saat)



Şekil 5.33. HP ve F9-HP kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği (9 saat)

5.1.7. Salım Kinetiği

Sıfırncı-derece, Sıfırncı-derece (T_{lag}), Sıfırncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3, Weibull 4, Logistic 1, Logistic 2, Logistic 3, Gompertz 1, Gompertz 2, Gompertz 3, Gompertz 4, Probit 1 ve Probit 2 modeller için ilk 6 saatlik, Rsqr [korelasyon katsayısı (r^2)], Rsqr_adj [düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$)], MSC [Model seçme kriteri] ve AIC [Akaike bilgi kriteri] değerleri, modellerin denklemleri ile beraber Tablo 5.8.'de sunulmuştur.

DDSolver programından alınan Sıfırncı-derece, Sıfırncı-derece (T_{lag}), Sıfırncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3, Weibull 4, Logistic 1, Logistic 2, Logistic 3, Gompertz 1, Gompertz 2, Gompertz 3, Gompertz 4, Probit 1 ve Probit 2 modeller için salım kinetik grafikleri sırasıyla Şekil 5.34.- Şekil 5.71.'de sunulmuştur.

Tablo 5.8. F9-HP kodlu formülasyon için 6 saatlik salın kinetiği sonuçları

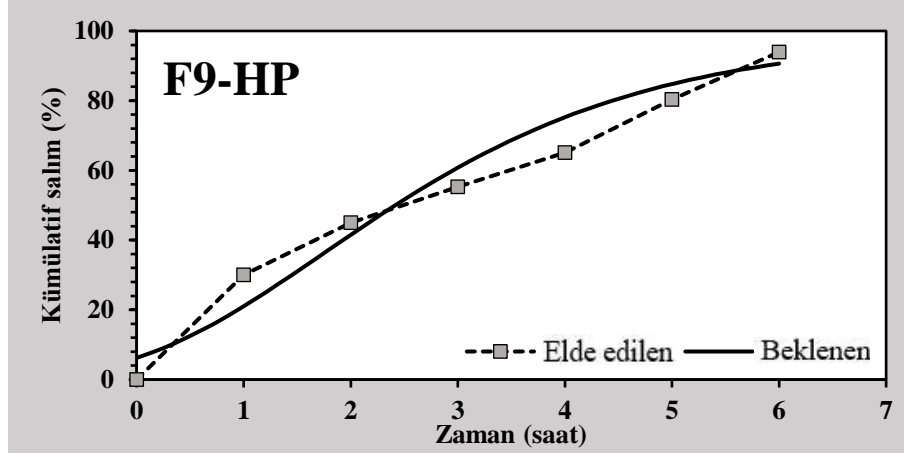
Model Kodu	Model ^a	r ²	r ² _{adjusted}	MSC	AIC
#301 ^b	Sıfıncı-derece $F=k_0 * t$	0.935	0.935	1.815	43.764
#302 ^{b, c}	Sıfıncı-derece (T_{lag}) $F=k_0 * (t-T_{lag})$	0.943	0.932	1.667	44.800
#303 ^{b, d}	Sıfıncı derece (F₀) $F=F_0+k_0 * t$	0.943	0.932	1.667	44.800
#304 ^e	Birinci-derece $F=100 * [1-Exp(-k_1 * t)]$	0.956	0.956	2.214	40.973
#305 ^{c, e}	Birinci-derece (T_{lag}) $F=100 * \{1-Exp[-k_1 * (t-T_{lag})]\}$	0.596	0.516	-0.292	58.516
#306 ^{e, f}	Birinci-derece (F_{max}) $F=F_{max} * [1-Exp(-k_1 * t)]$	0.931	0.917	1.471	46.170
#307 ^{c, e, f}	Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}) $F=F_{max} * \{1-Exp[-k_1 * (t-T_{lag})]\}$	0.410	0.115	-0.958	63.177
#308 ^g	Higuchi $F=k_H * t^{0.5}$	0.972	0.972	2.657	37.871
#309 ^{c, g}	Higuchi (T_{lag}) $F=k_H * (t-T_{lag})^{0.5}$	0.975	0.971	2.506	38.927
#310 ^{d, g}	Higuchi (F₀) $F=F_0+k_H * t^{0.5}$	0.947	0.937	1.744	44.260
#311 ^h	Korsmeyer-Peppas $F=k_{KP} * t^n$	0.991	0.990	3.565	31.512
#312 ^{c, h}	Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) $F=k_{KP} * (t-T_{lag})^n$	0.983	0.975	2.617	38.152
#313 ^{d, h}	Korsmeyer-Peppas (F₀) $F=F_0+k_{KP} * t^n$	0.991	0.987	3.280	33.512
#314 ⁱ	Hixson-Crowell $F=100 * [1-(1-k_{HC} * t)^3]$	0.975	0.975	2.764	37.121
#315 ^{c, i}	Hixson-Crowell (T_{lag}) $F=100 * \{1-[1-k_{HC} * (t-T_{lag})]^3\}$	0.964	0.957	2.118	41.641
#316 ^j	Hopfenberg $F=100 * [1-(1-k_{HB} * t)^n]$	0.976	0.972	2.547	38.643
#317 ^{c, j}	Hopfenberg (T_{lag}) $F=100 * \{1-[1-k_{HB} * (t-T_{lag})]^n\}$	0.980	0.970	2.427	39.477
#318 ^k	Baker-Lonsdale	0.928	0.928	1.717	44.448

	$3/2 * [1 - (1 - F/100)^{(2/3)}] - F/100 = k_{BL} * t$				
#319 ^{c, k}	Baker-Lonsdale (T_{lag}) $3/2 * [1 - (1 - F/100)^{(2/3)}] - F/100 = k_{BL} * (t - T_{lag})$	0.817	0.781	0.499	52.977
#322 ^m	Peppas-Sahlin 1 $F = k_1 * t^m + k_2 * t^{(2*m)}$	0.995	0.992	3.803	29.850
#323 ^{c, m}	Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}) $F = k_1 * (t - T_{lag})^m + k_2 * (t - T_{lag})^{(2*m)}$	0.991	0.981	2.899	36.178
#324 ⁿ	Peppas-Sahlin 2 $F = k_1 * t^{0.5} + k_2 * t$	0.995	0.994	4.118	27.644
#325 ^{c, n}	Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}) $F = k_1 * (t - T_{lag})^{0.5} + k_2 * (t - T_{lag})$	0.990	0.985	3.121	34.620
#326 ^o	Quadratic $F = 100 * (k_1 * t^2 + k_2 * t)$	0.977	0.972	2.557	38.568
#327 ^{c, o}	Quadratic (T_{lag}) $F = k_1 * (t - T_{lag})^{0.5} + k_2 * (t - T_{lag})$	0.924	0.885	1.087	48.862
#328 ^{p, q}	Weibull 1 $F = 100 * \{1 - \text{Exp}[-((t - T_i)^\beta)/\alpha]\}$	0.959	0.938	1.701	44.564
#329 ^p	Weibull 2 $F = 100 * \{1 - \text{Exp}[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.969	0.963	2.288	40.455
#330 ^{f, p}	Weibull 3 $F = F_{max} * \{1 - \text{Exp}[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.967	0.951	1.934	42.929
#331 ^{f, p, q}	Weibull 4 $F = F_{max} * \{1 - \text{Exp}[-((t - T_i)^\beta)/\alpha]\}$	0.956	0.913	1.362	46.937
	Logistic 1				
#332 ^r	$F = 100 * \text{Exp}[\alpha + \beta * \log(t)] / \{1 + \text{Exp}[\alpha + \beta * \log(t)]\}$	0.938	0.926	1.583	45.385
	Logistic 2				
#333 ^{f, r}	$F = F_{max} * \text{Exp}[\alpha + \beta * \log(t)] / \{1 + \text{Exp}[\alpha + \beta * \log(t)]\}$	0.931	0.896	1.187	48.162
	Logistic 3				
#334 ^{f, s}	$F = F_{max} / \{1 + \text{Exp}[-k * (t - \gamma)]\}$	0.940	0.909	1.322	47.215
	Gompertz 1				
#335 ^t	$F = 100 * \text{Exp}\{-\alpha * \text{Exp}[-\beta * \log(t)]\}$	0.902	0.883	1.128	48.575
	Gompertz 2				
#336 ^{f, t}	$F = F_{max} * \text{Exp}\{-\alpha * \text{Exp}[-\beta * \log(t)]\}$	0.891	0.836	0.727	51.377
	Gompertz 3				
#337 ^{f, u}	$F = F_{max} * \text{Exp}\{-\text{Exp}[-k * (t - \gamma)]\}$	0.950	0.926	1.519	45.836
	Gompertz 4				
#338 ^{f, v}	$F = F_{max} * \text{Exp}[-\beta * \text{Exp}(-k * t)]$	0.950	0.926	1.519	45.836

#339 ^w	Probit 1 $F=100 * \Phi[\alpha+\beta * \log(t)]$	0.947	0.936	1.734	44.331
#340 ^{f, w}	Probit 2 $F=F_{max} * \Phi[\alpha+\beta * \log(t)]$	0.942	0.913	1.364	46.924

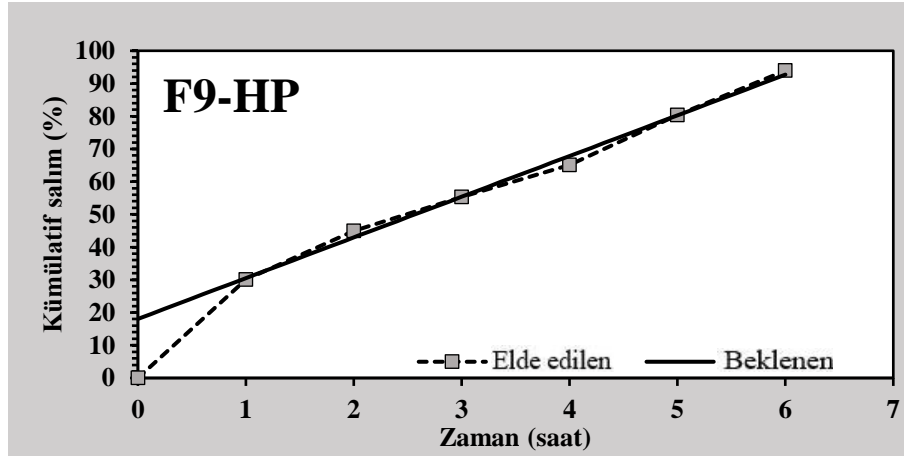
[Tablo 5.8. (Devam) F9-HP kodlu formülasyon için 6 saatlik salım kinetiği sonuçları]

Açıklamalar: **Rsqr** korelasyon katsayısı (r^2); **Rsqr_adj** düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$); **AIC** Akaike bilgi kriteri; **MSC** Model seçme kriteri; ^a Tüm modellerde **F**, **t** zamanında salınan ilacın fraksiyonudur (%); ^b k_0 sıfır dereceli serbest bırakma sabitidir; ^c T_{lag} ilaç salınımından önceki gecikme süresidir; ^d F_0 bir patlama salımından kaynaklanan çözeltideki ilacın başlangıç fraksiyonudur; ^e k_1 birinci dereceden serbest bırakma sabitidir; ^f F_{max} sonsuz zamanda salınan ilacın maksimum fraksiyonudur; ^g k_H Higuchi salım sabitidir; ^h k_{KP} ilaç dozaj formunun yapısal ve geometrik özelliklerini içeren salım sabitidir; **n** ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyon üssüdür; ⁱ k_{HC} Hixson–Crowell modelindeki salım sabitidir; ^j k_{HB} Hopfenberg modelindeki birleşik sabittir, $k_{HB}=k_0/(C_0 \times a_0)$, burada k_0 erozyon oranı sabitidir, C_0 matristeki ilk ilaç konsantrasyonudur ve a_0 bir küre veya silindir için başlangıç yarıçapıdır veya bir levhanın yarı kalınlığı, **n** bir levha, silindir ve küre için sırasıyla 1, 2 ve 3'tür; ^k k_{BL} , Baker-Lonsdale modelindeki birleşik sabittir, $k_{BL}=[3 \times D \times C_s / (r_0^2 \times C_0)]$, burada **D** difüzyon katsayısıdır, C_s doyma çözünürlüğüdür, r_0 bir küre için başlangıç yarıçapıdır veya bir levha için silindir veya yarı kalınlık ve C_0 matristeki ilk ilaç yüklemesidir; ^m k_1 Fickian kinetiğiyle ilgili sabittir, k_2 Durum-II gevşeme kinetiğiyle ilgili sabittir, **m** kontrollü salınımı engelleyen herhangi bir geometrik şekle sahip bir cihazın yayılma üssüdür; ⁿ $k_1 t^{0.5}$ 'e bağlı ilaç difüzyonunun ilaç salımına nispi katkısını gösteren sabittir, k_2 , t 'ye bağlı polimer gevşemesinin ilaç salımına nispi katkısını gösteren sabittir; ^o $k_1 t^2$ 'ye bağlı ilaç salımının nispi katkısını gösteren Quadratic modeldeki sabittir, k_2 , t 'ye bağlı ilaç salımının nispi katkısını gösteren Quadratic modeldeki sabittir; ^p α , sürecin zaman ölçeğini tanımlayan ölçek parametresidir, β eğriyi ya üstel ($\beta=1$; durum 1), sigmoid, S-şekilli, yukarı doğru eğrilik ve ardından bir dönüş noktası ($\beta>1$; durum 2), ya da daha yüksek bir başlangıç eğimi ile ve bundan sonra üstel ile tutarlı ($\beta<1$; durum 3) şekil parametresidir; ^q **Ti**, çözünme veya salıverme sürecinin başlangıcından önceki gecikme süresini temsil eden konum parametresidir ve çoğu durumda sıfıra yakın olmaktadır; ^r α Logistic 1 ve 2 modellerinde ölçek faktörüdür, β , Logistic 1 ve 2 modellerinde şekil faktörüdür; ^s **k** Logistic 3 modelindeki şekil faktörüdür, $\gamma F = F_{max}/2$ olduğu zamandır; ^t α , Gompertz 1 ve 2 modellerinde ölçek faktörüdür, β Gompertz 1 ve 2 modellerinde şekil faktörüdür; ^u **k** Gompertz 3 modelindeki şekil faktörüdür, $\gamma F = F_{max}/\exp(1) \approx 0.368 \times F_{max}$ 'ın olduğu zamandır; ^v β Gompertz 4 modelindeki ölçek faktörüdür, **k** Gompertz 4 modelindeki şekil faktörüdür; ^w Φ standart normal dağılımdır, α Probit modelindeki ölçek faktörüdür, β Probit modelindeki şekil faktörüdür.



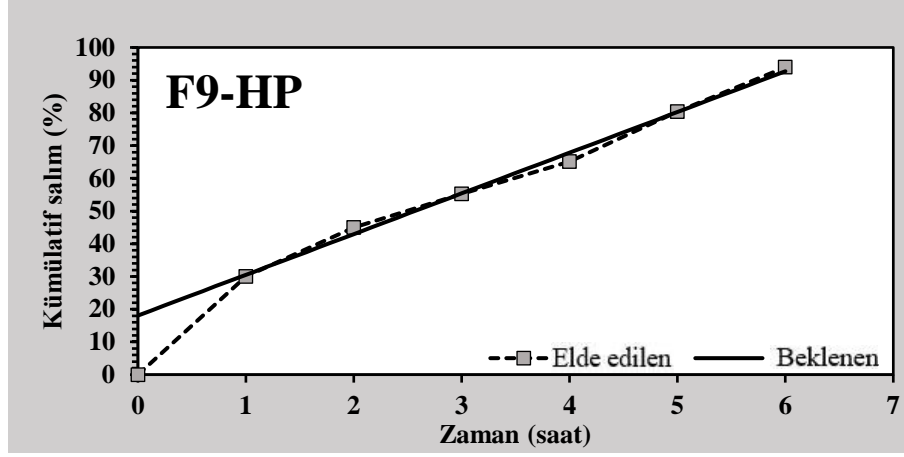
Şekil 5.34. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Sıfırıncı derece kinetik için beklenen salım profili



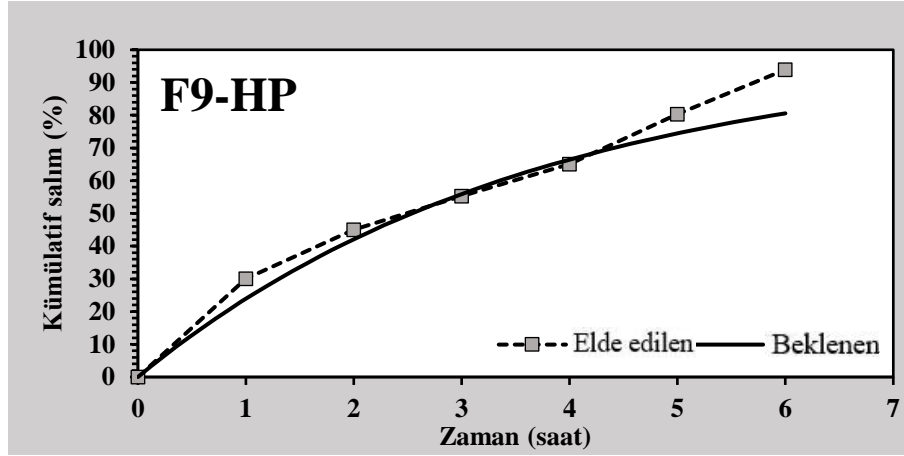
Şekil 5.35. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Sıfırıncı derece kinetik (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



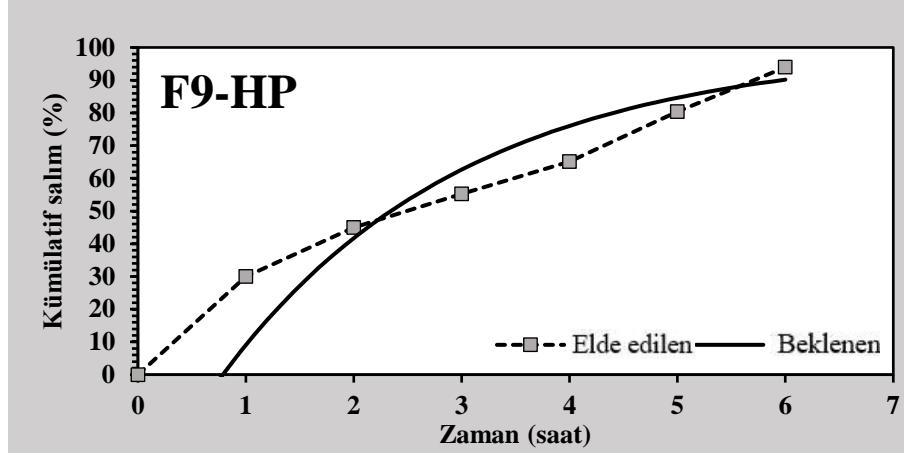
Şekil 5.36. F9-HP formülasyonu için salm kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, F_0)

***Elde edilen:** Elde edilen salm profili, **Beklenen:** Sıfırıncı derece kinetik (F_0 ile) için beklenen salm profili



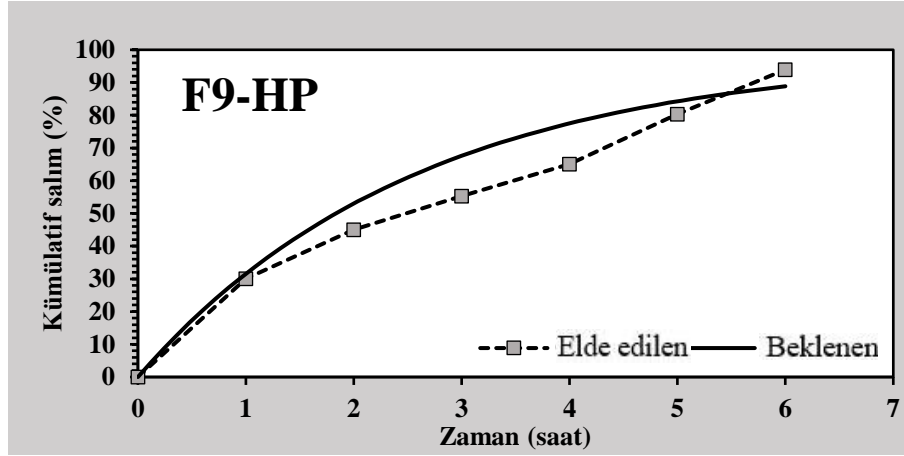
Şekil 5.37. F9-HP formülasyonu için salm kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik)

***Elde edilen:** Elde edilen salm profili, **Beklenen:** Birinci derece kinetik için beklenen salm profili



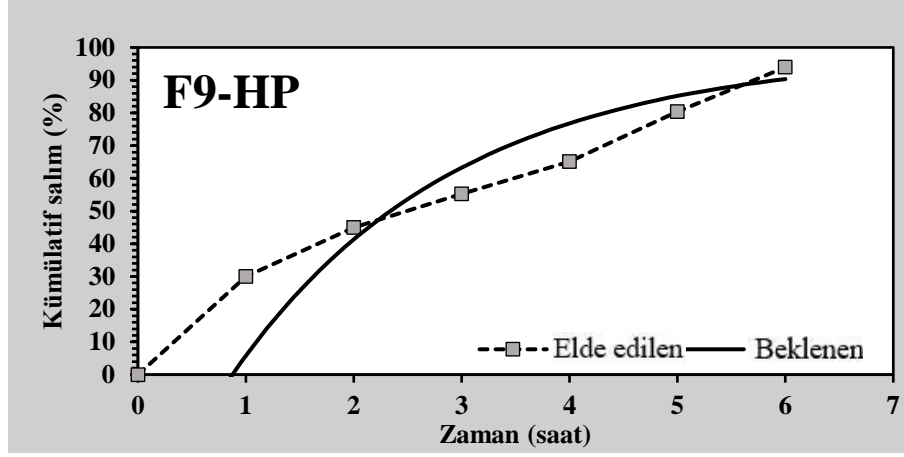
Şekil 5.38. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Birinci derece kinetik (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



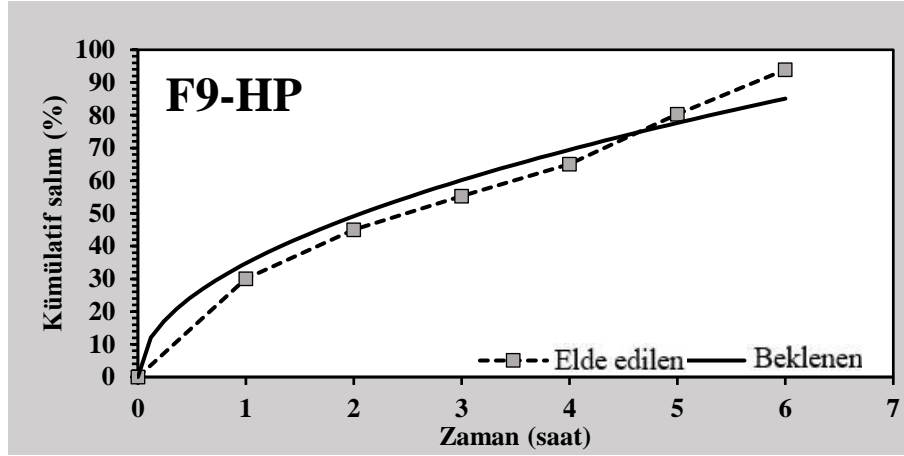
Şekil 5.39. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Birinci derece kinetik (F_{max} ile) için beklenen salım profili



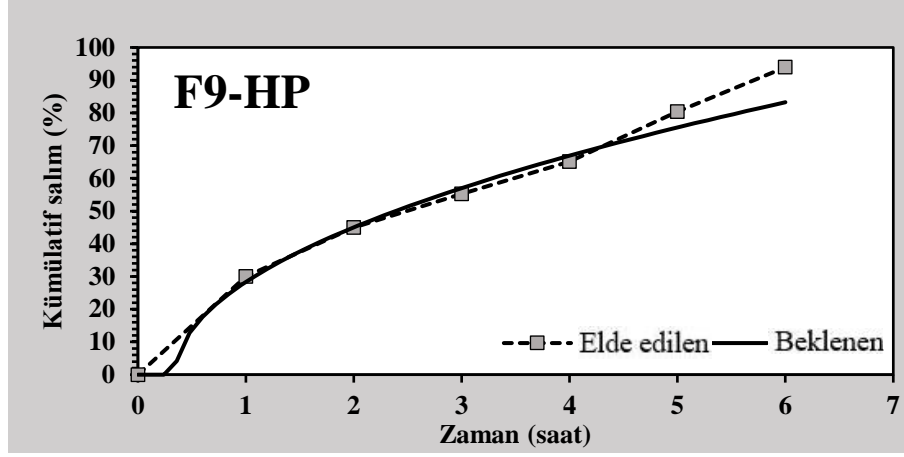
Şekil 5.40. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max} ve T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Birinci derece kinetik (F_{max} ve T_{lag} ile) için beklenen salım profili



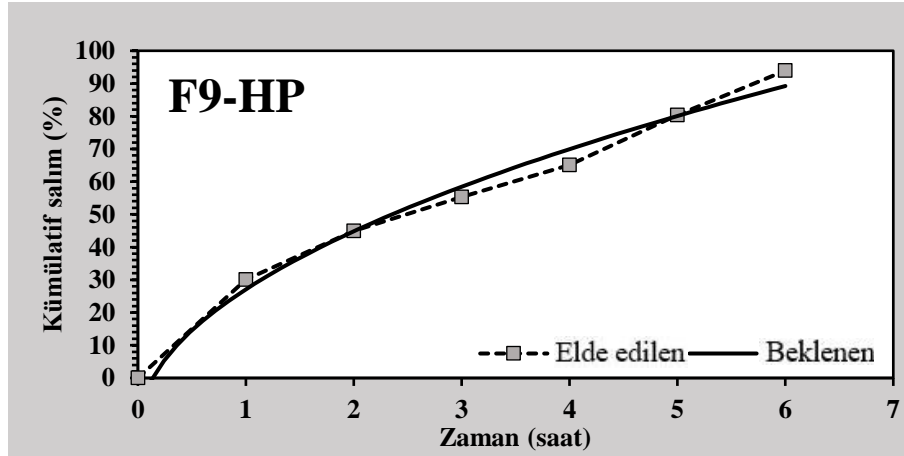
Şekil 5.41. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Higuchi Modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Higuchi Modeli için beklenen salım profili



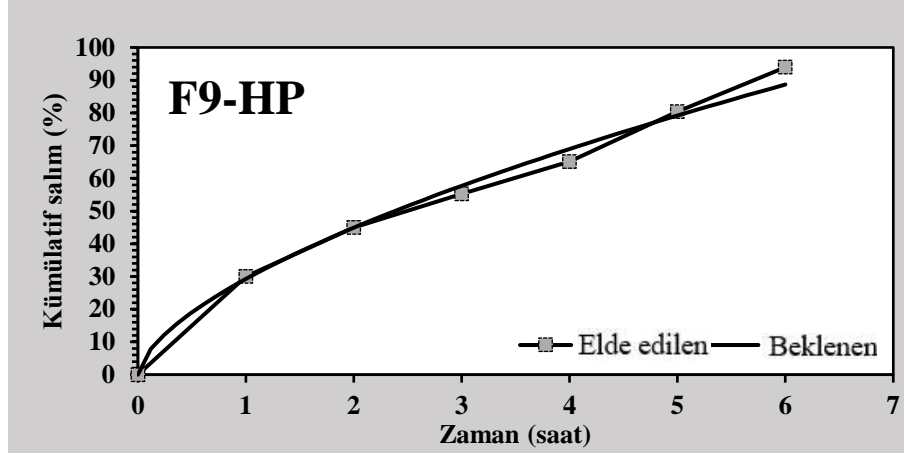
Şekil 5.42. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Higuchi modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



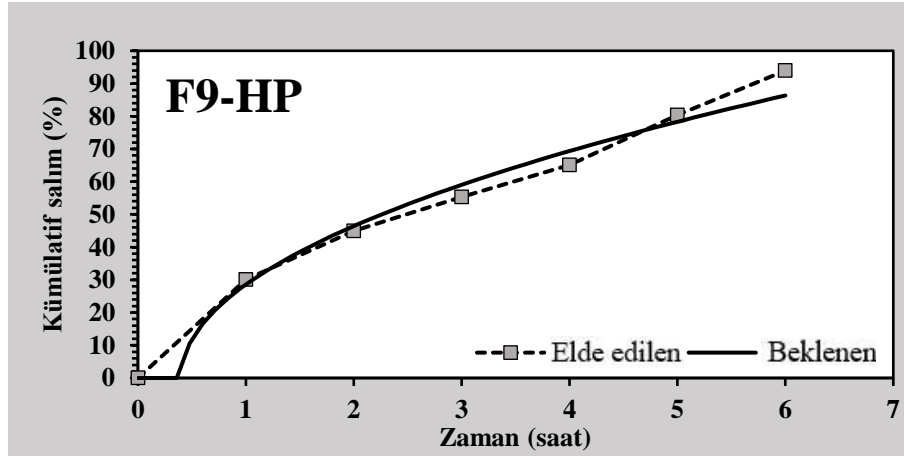
Şekil 5.43. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, F_0)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Higuchi modeli (F_0 ile) için beklenen salım profili



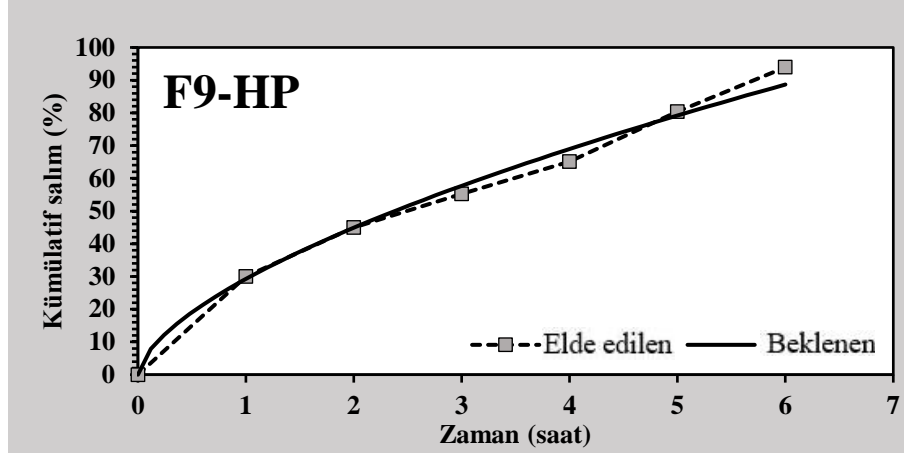
Şekil 5.44. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen salım profili



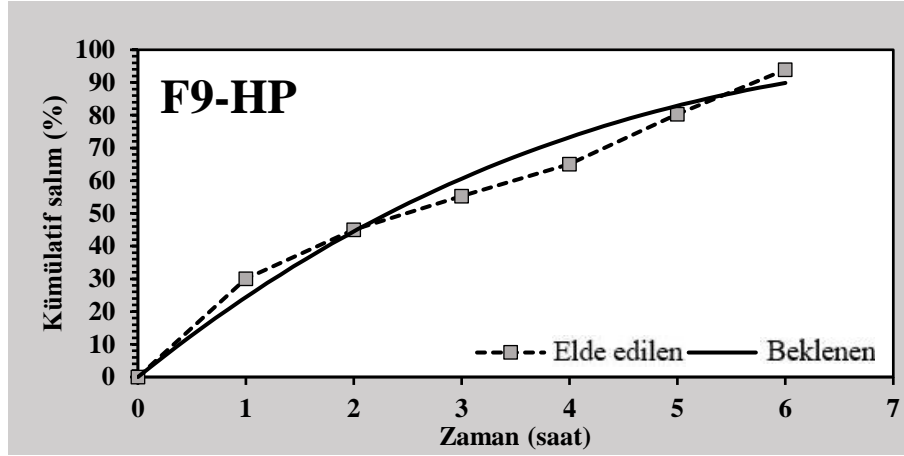
Şekil 5.45. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Korsmeyer-Peppas modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



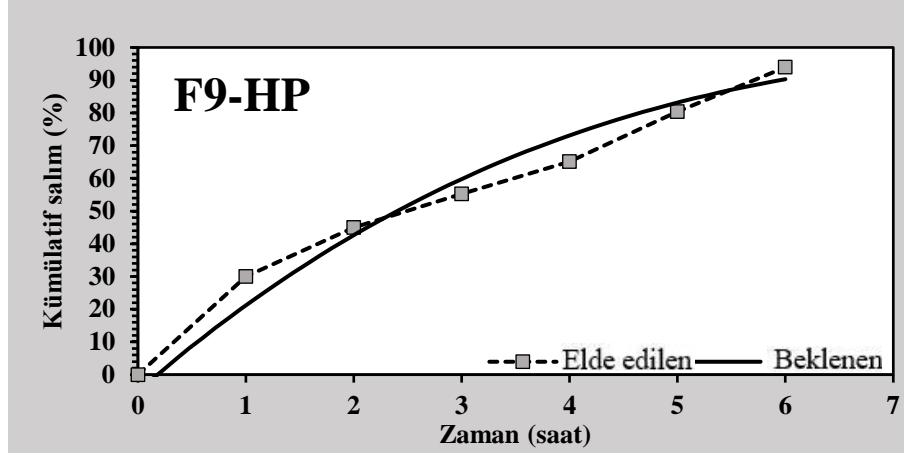
Şekil 5.46. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas modeli, F_0)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Korsmeyer-Peppas modeli (F_0 ile) için beklenen salım profili



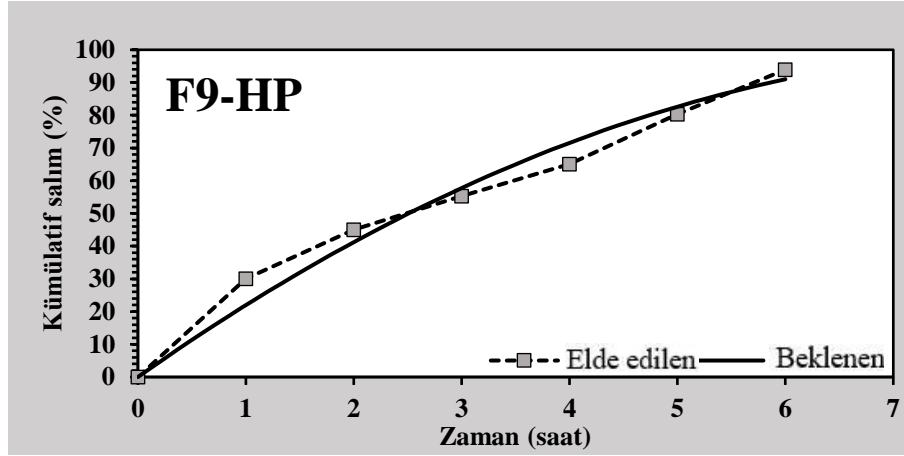
Şekil 5.47. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Hixson-Crowell modeli için beklenen salım profili



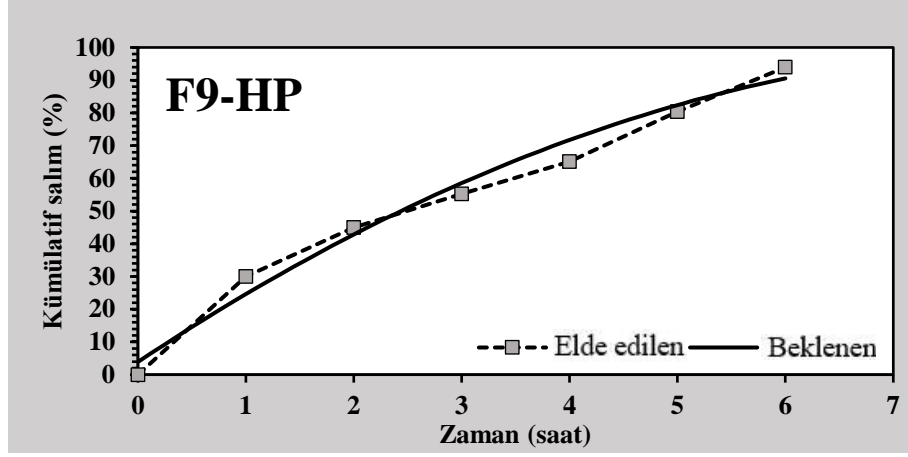
Şekil 5.48. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Hixson-Crowell modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



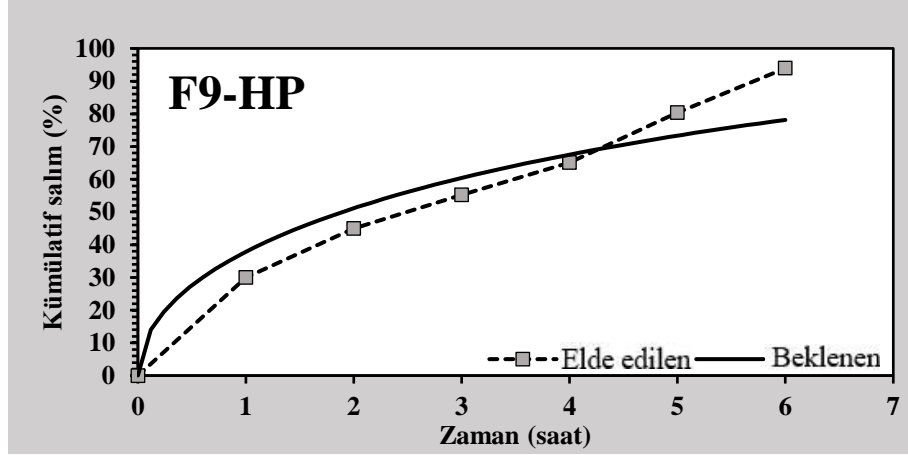
Şekil 5.49. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Hopfenberg modeli için beklenen salım profili



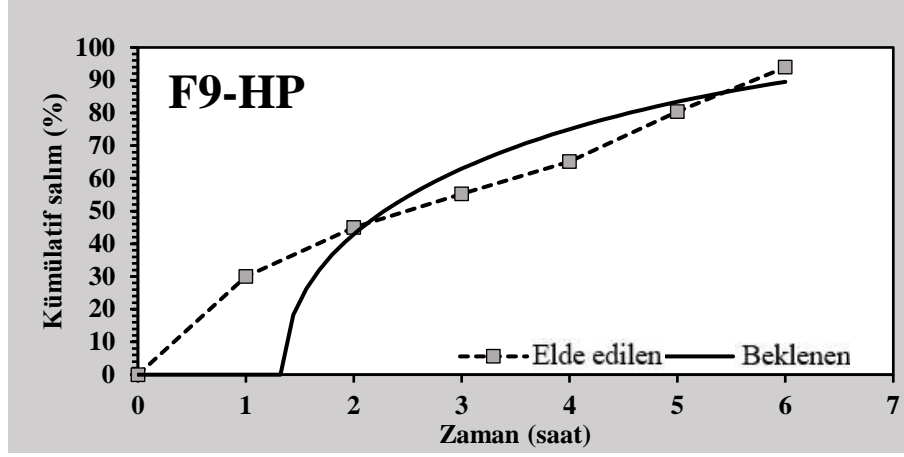
Şekil 5.50. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Hopfenberg modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



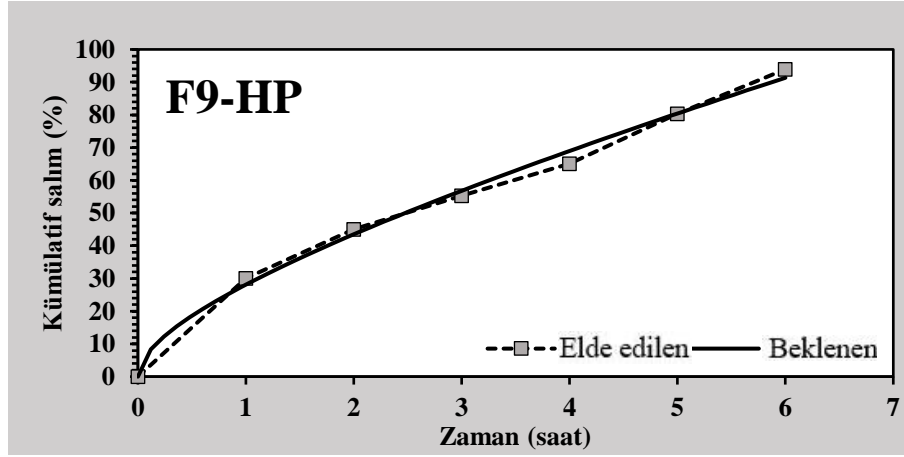
Şekil 5.51. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Baker-Lonsdale modeli için beklenen salım profili



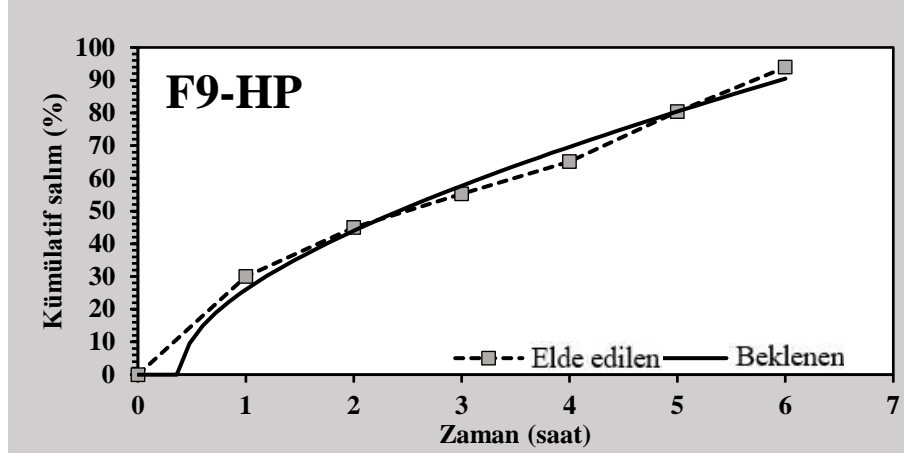
Şekil 5.52. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Baker-Lonsdale modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



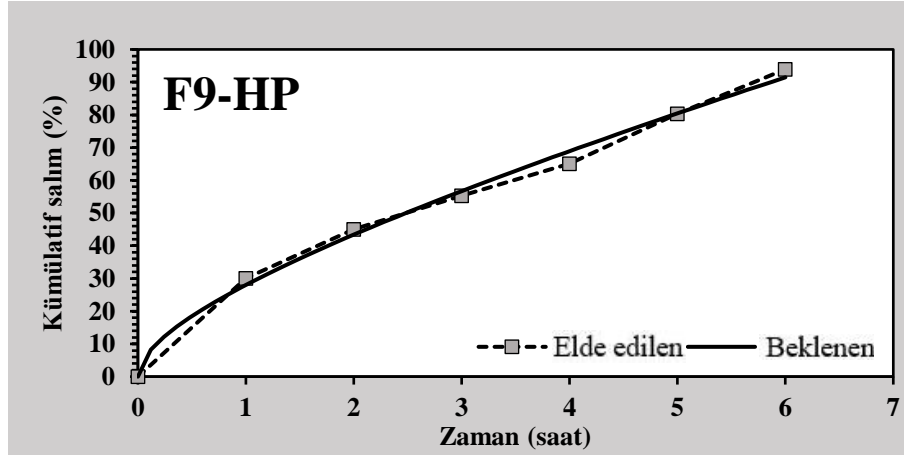
Şekil 5.53. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Peppas-Sahlin 1 modeli için beklenen salım profili



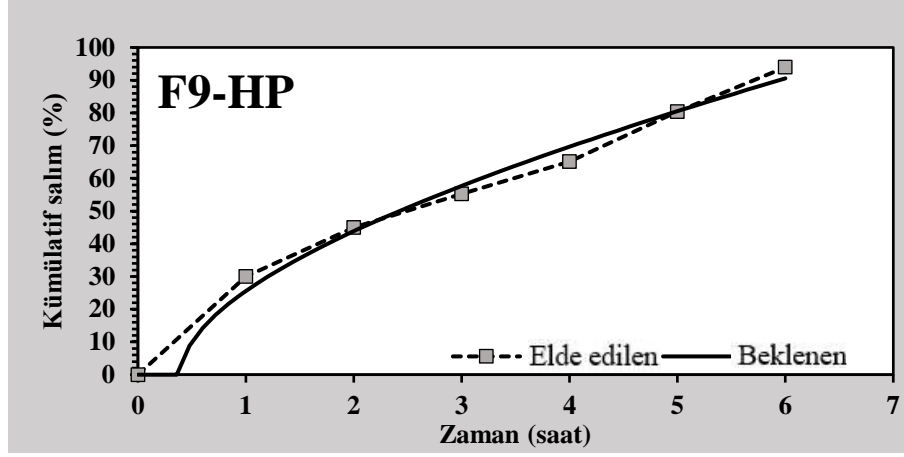
Şekil 5.54. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Peppas-Sahlin 1 modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



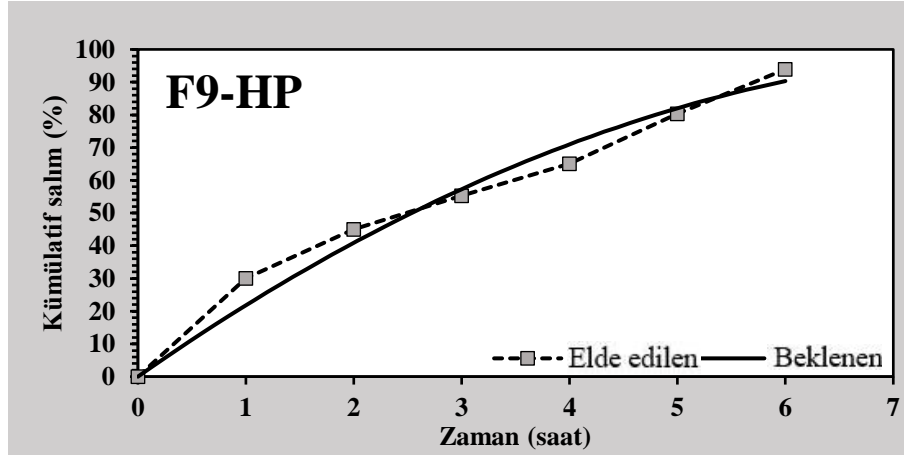
Şekil 5.55. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Peppas-Sahlin 2 modeli için beklenen salım profili



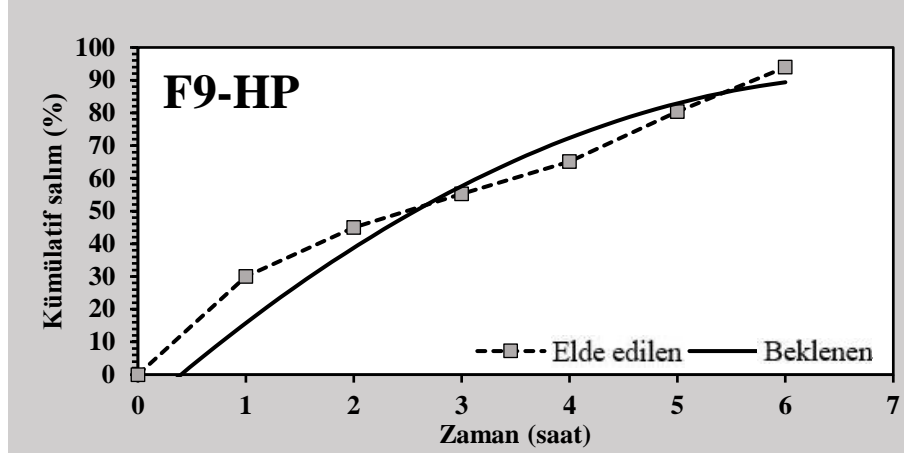
Şekil 5.56. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Peppas-Sahlin 2 modeli (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



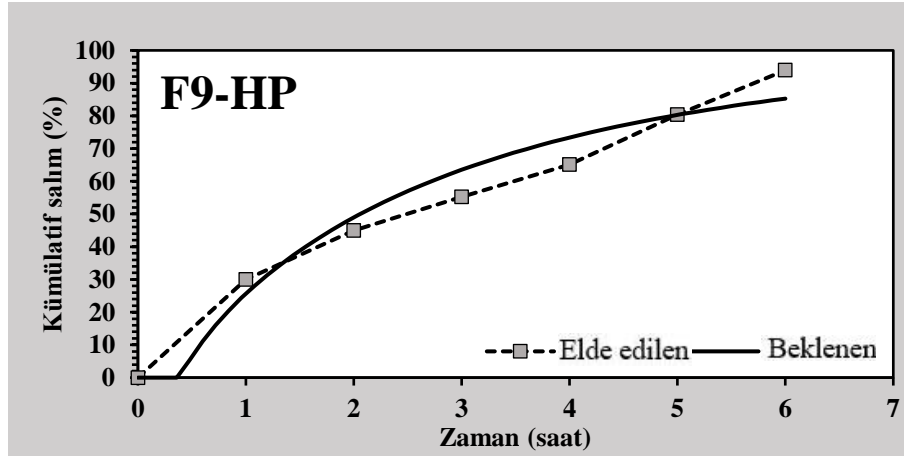
Şekil 5.57. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Quadratic model)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Quadratic model için beklenen salım profili



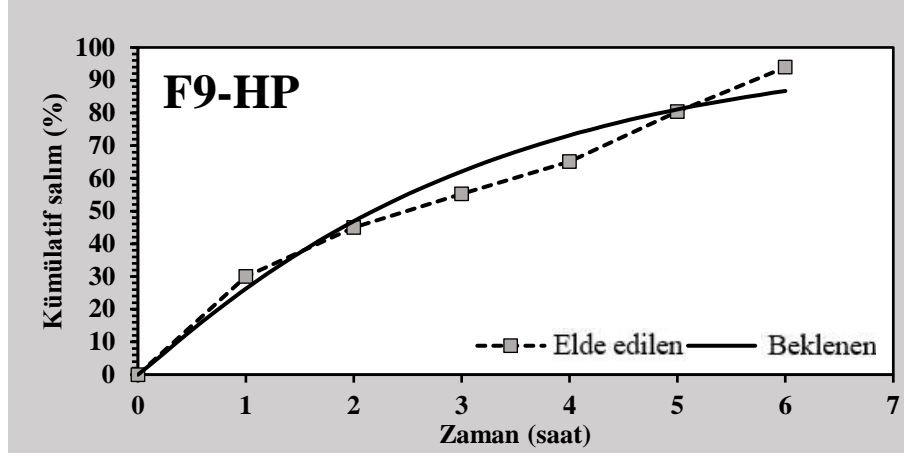
Şekil 5.58. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Quadratic model, T_{lag})

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Quadratic model (T_{lag} ile) için beklenen salım profili



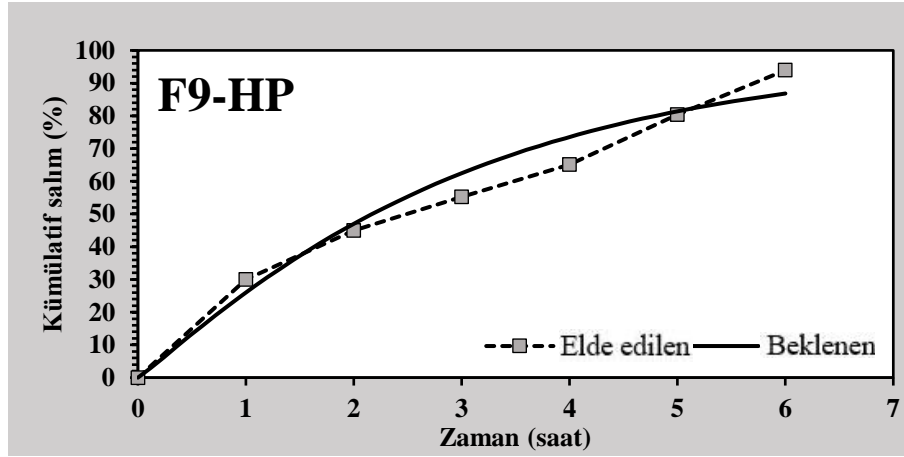
Şekil 5.59. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 1 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Weibull 1 modeli için beklenen salım profili



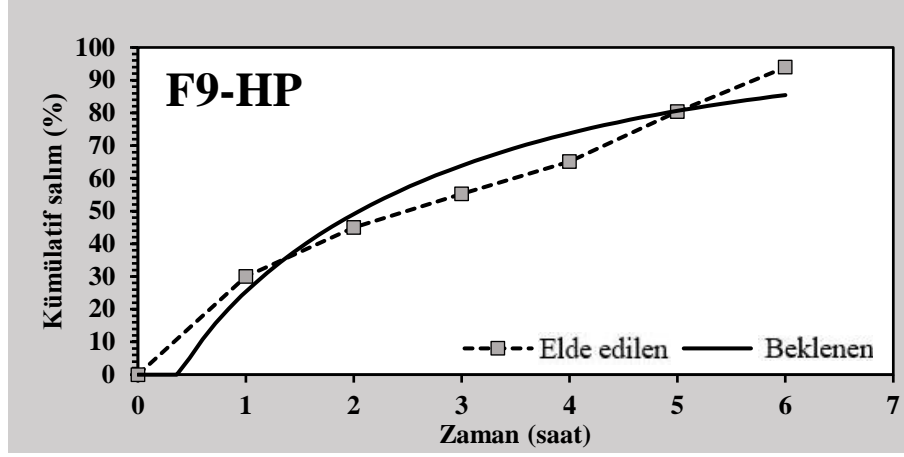
Şekil 5.60. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 2 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Weibull 2 modeli için beklenen salım profili



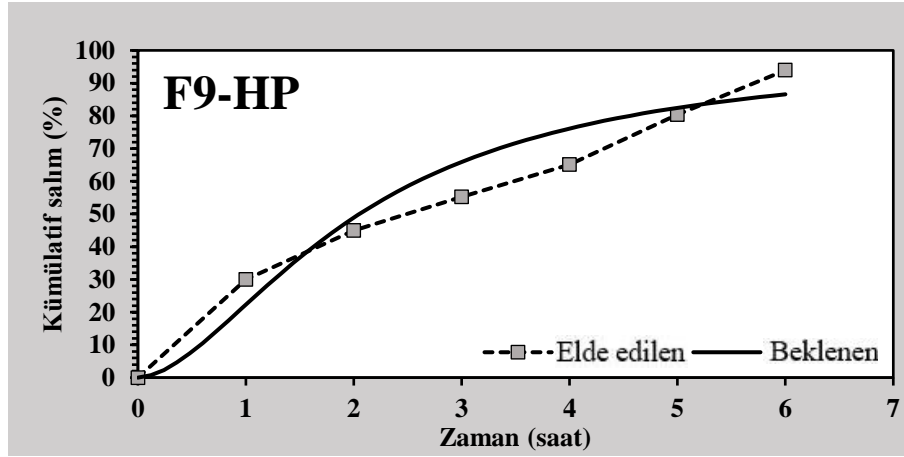
Şekil 5.61. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 3 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Weibull 3 modeli için beklenen salım profili



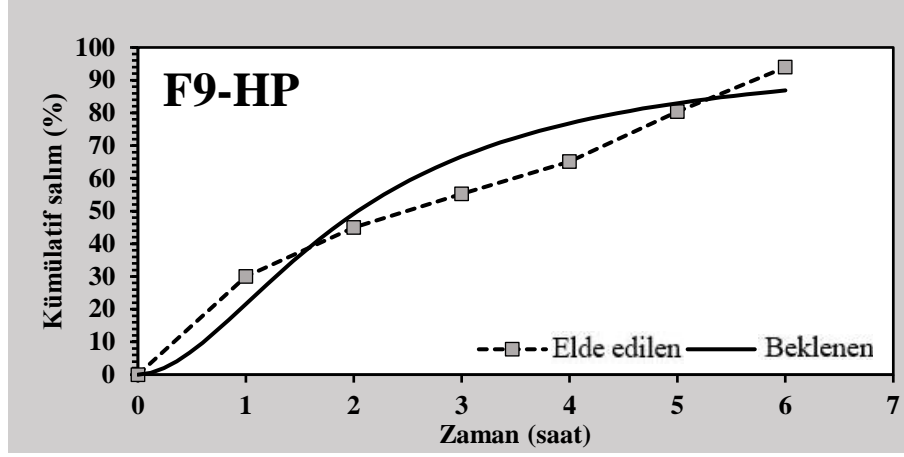
Şekil 5.62. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Weibull 4 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Weibull 4 modeli için beklenen salım profili



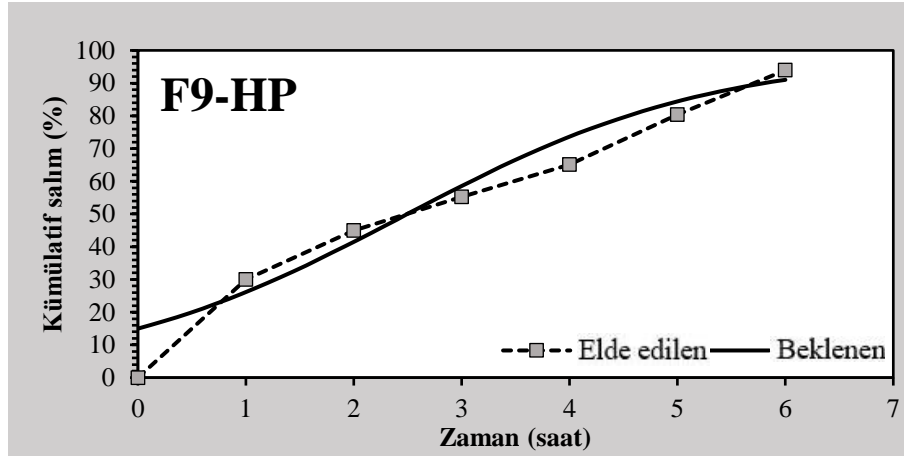
Şekil 5.63. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Logistic 1 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Logistic 1 modeli için beklenen salım profili



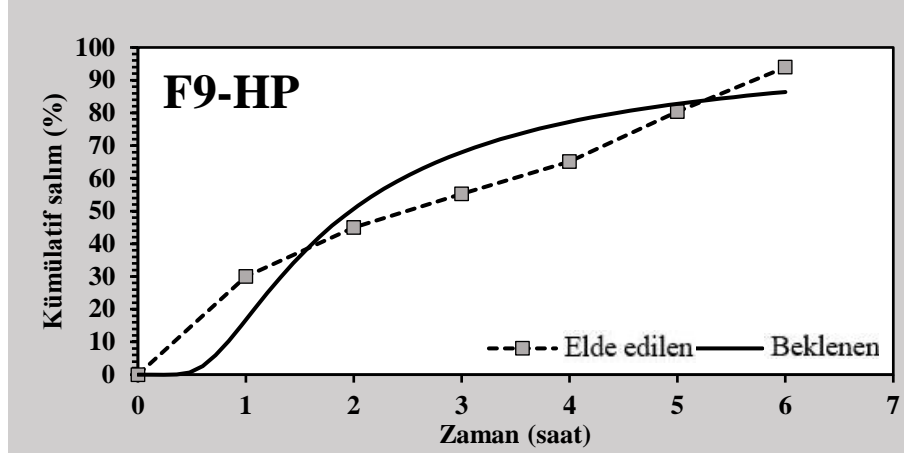
Şekil 5.64. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Logistic 2 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Logistic 2 modeli için beklenen salım profili



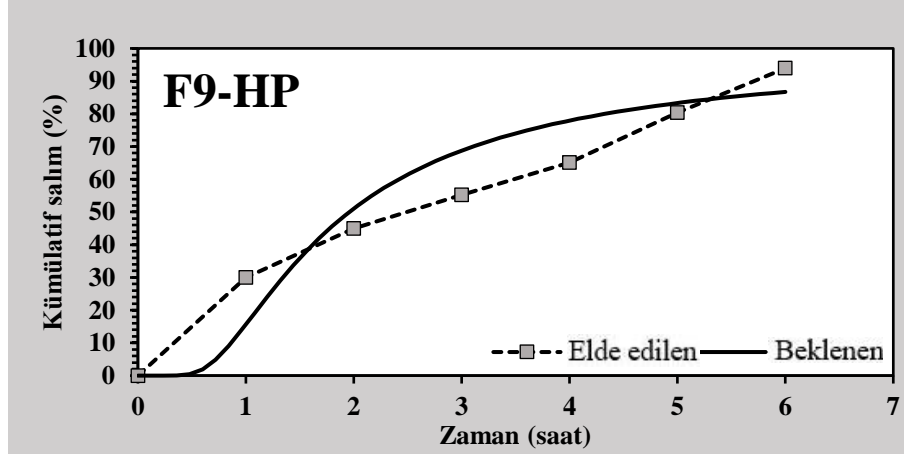
Şekil 5.65. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Logistic 3 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Logistic 3 modeli için beklenen salım profili



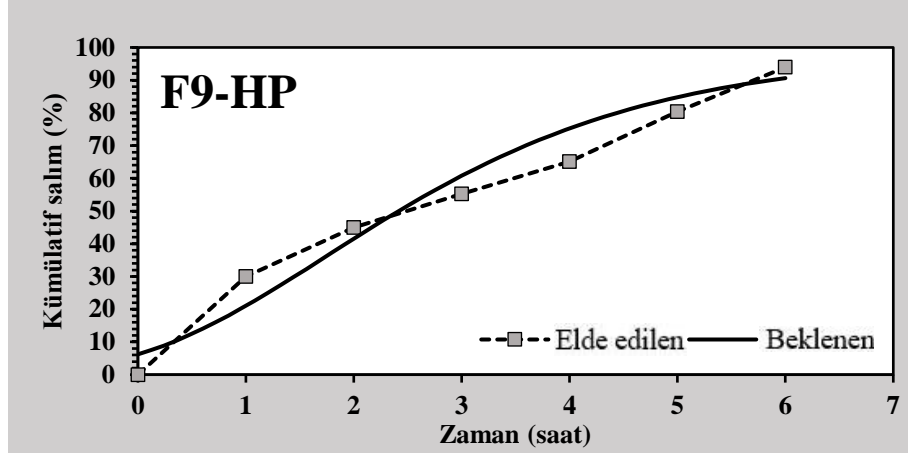
Şekil 5.66. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 1 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Gompertz 1 modeli için beklenen salım profili



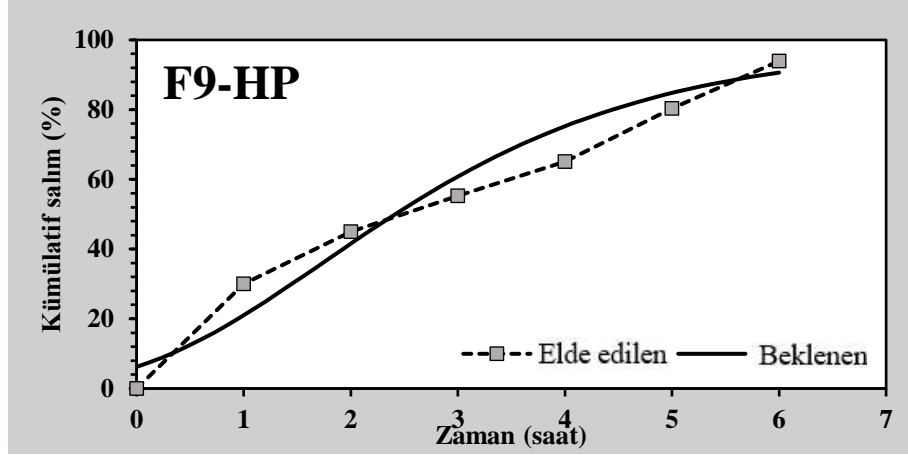
Şekil 5.67. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 2 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Gompertz 2 modeli için beklenen salım profili



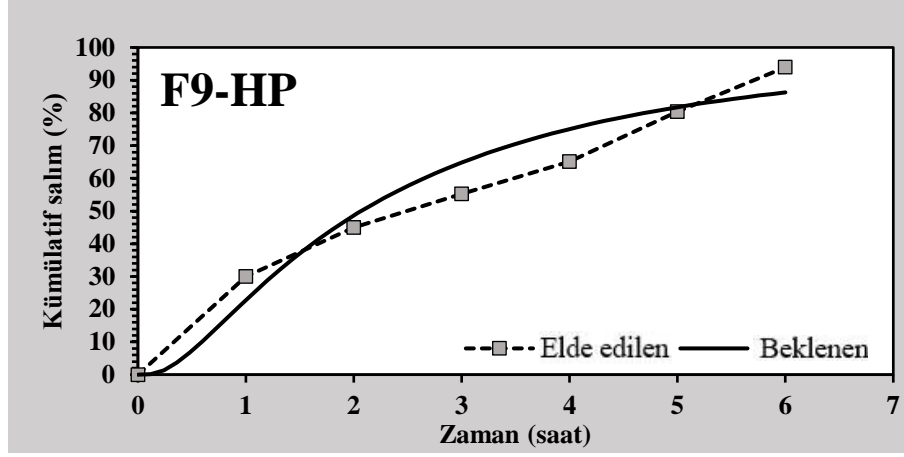
Şekil 5.68. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 3 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Gompertz 3 modeli için beklenen salım profili



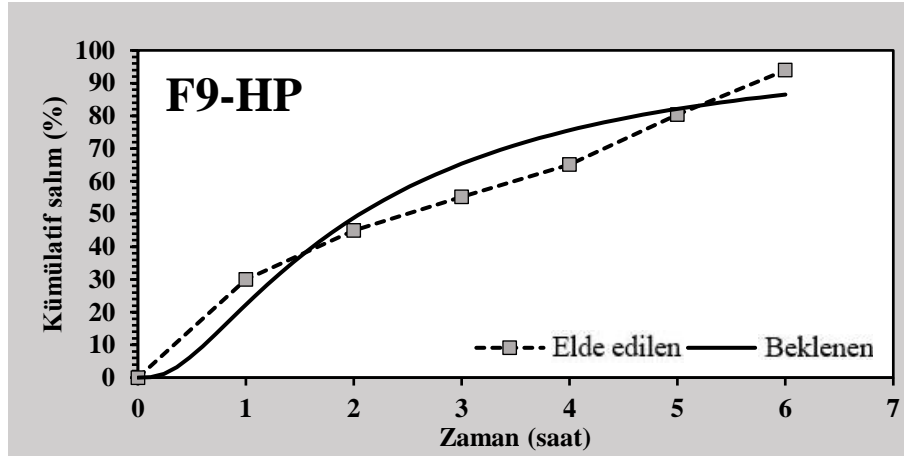
Şekil 5.69. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Gompertz 4 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Gompertz 4 modeli için beklenen salım profili



Şekil 5.70. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Probit 1 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Probit 1 modeli için beklenen salım profili



Şekil 5.71. F9-HP formülasyonu için salım kinetik modeli (Probit 2 modeli)

***Elde edilen:** Elde edilen salım profili, **Beklenen:** Probit 2 modeli için beklenen salım profili

5.2. Biyolojik aktivite çalışmaları sonuçları

5.2.1. *In vitro* antioksidan aktivite çalışmaları sonuçları

5.2.1.1. *Metal şelatlayıcı yöntem sonuçları*

Metal şelatlayıcı yöntem sonuçları Tablo 5.9.'da sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre EDTA ile karşılaştırıldığında en yüksek metal şelatlayıcı antioksidan aktiviteyi F9-HP kodlu formülasyon gösterirken en düşük aktiviteyi HP metanol ekstresi göstermiştir. Kitosanın da metal şelatlayıcı antioksidan aktivitesi olduğu gözlenmiş olup aktivite sıralaması EDTA > F9-HP > F9 (Boş formülasyon) > HP metanol ekstresi olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.9. HP, F9-HP ve F9 için metal şelatlayıcı yöntem aktivite sonuçları

Test maddesi	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
HP	6.2972 ± 0.001
F9-HP	0.3790 ± 0.002
F9 (Boş formülasyon)	0.4180 ± 0.001
EDTA	0.1250 ± 0.003

*(-) aktivite görülmemiştir.

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

ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon renksizleştirme yöntemi sonuçları Tablo 5.10.'da sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre BHT ve Askorbik asit ile karşılaştırıldığında en yüksek ABTS^{•+} katyon renksizleştirici antioksidan aktiviteyi HP jel gösterirken en düşük aktiviteyi HP metanol ekstresi göstermiştir. Kitosanda ABTS^{•+} katyon renksizleştirici antioksidan aktivitesi var olduğu gözlemlenmiş olup aktivite sıralaması Askorbik asit > BHT > F9-HP > F9 (Boş formülasyon) > HP metanol ekstresi olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.10. HP, F9-HP ve F9 için ABTS^{•+} yöntemi aktivite sonuçları

Test maddesi	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
HP	3.7537 ± 0.001
F9-HP	0.5120 ± 0.005
F9 (Boş formülasyon)	1.7060 ± 0.001
Askorbik asit	0.2543 ± 0.002
BHT	0.4326 ± 0.001

*(-) aktivite görülmemiştir.

5.2.1.3. Redükleyici güç sonuçları

Redükleyici güç yöntemi sonuçları Tablo 5.11.'de sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre BHT ve Askorbik asit ile karşılaştırıldığında en yüksek Redükleyici gücü HP metanol ekstresi gösterirken en düşük aktiviteyi F9-HP kodlu formülasyon göstermiştir. F9 (boş formülasyon) ise etki göstermemiştir. Aktivite sıralaması Askorbik asit > BHT > HP metanol ekstresi > F9-HP olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.11. HP, F9-HP ve F9 için Redükleyici güç yöntemi aktivite sonuçları

Test maddesi	EC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
HP	1.8587
F9-HP	4.8076
F9 (Boş formülasyon)	-
Askorbik asit	0.085
BHT	0.1564

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

5.2.1.4. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem sonuçları

DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi sonuçları Tablo 5.12.'de sunulmuştur. Aktivite sonuçlarına göre BHT ile karşılaştırıldığında en yüksek DPPH serbest radikal süpürücü antioksidan aktiviteyi HP metanol ekstresi gösterirken en düşük aktiviteyi F9-HP göstermiştir. F9 (boş formülasyon) ise etki göstermemiştir. Aktivite sıralaması BHT > HP metanol ekstresi > F9-HP olarak elde edilmiştir.

Tablo 5.12. HP, F9-HP ve F9 için DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi aktivite sonuçları

Test maddesi	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
HP	0.0023 ± 0.003
F9-HP	0.1109 ± 0.001
Boş	-
BHT	0.0011 ± 0.001

*(-) aktivite görülmemiştir

Sonuç olarak antioksidan aktivite sonuçlarına göre F9-HP kodlu formülasyon belirgin bir şekilde *DPPH serbest radikal süpürücü*, *ABTS^{•+} kasyon renksizleştirici* ve *Metal şelatlayıcı* antioksidan aktivite gösterirken zayıf redükleyici antioksidan potansiyel göstermiştir.

5.2.2. HET-CAM (hen's egg test on the chorioallantoic membrane assay) yöntemi ile *in vivo* antiinflamatuvar etkinliği sonuçları

HP ve F9-HP kodlu formülasyonun ve kontrollerin *in vivo* antiinflamatuvar etki sonuçları Tablo 5.13.'te sunulmuştur.

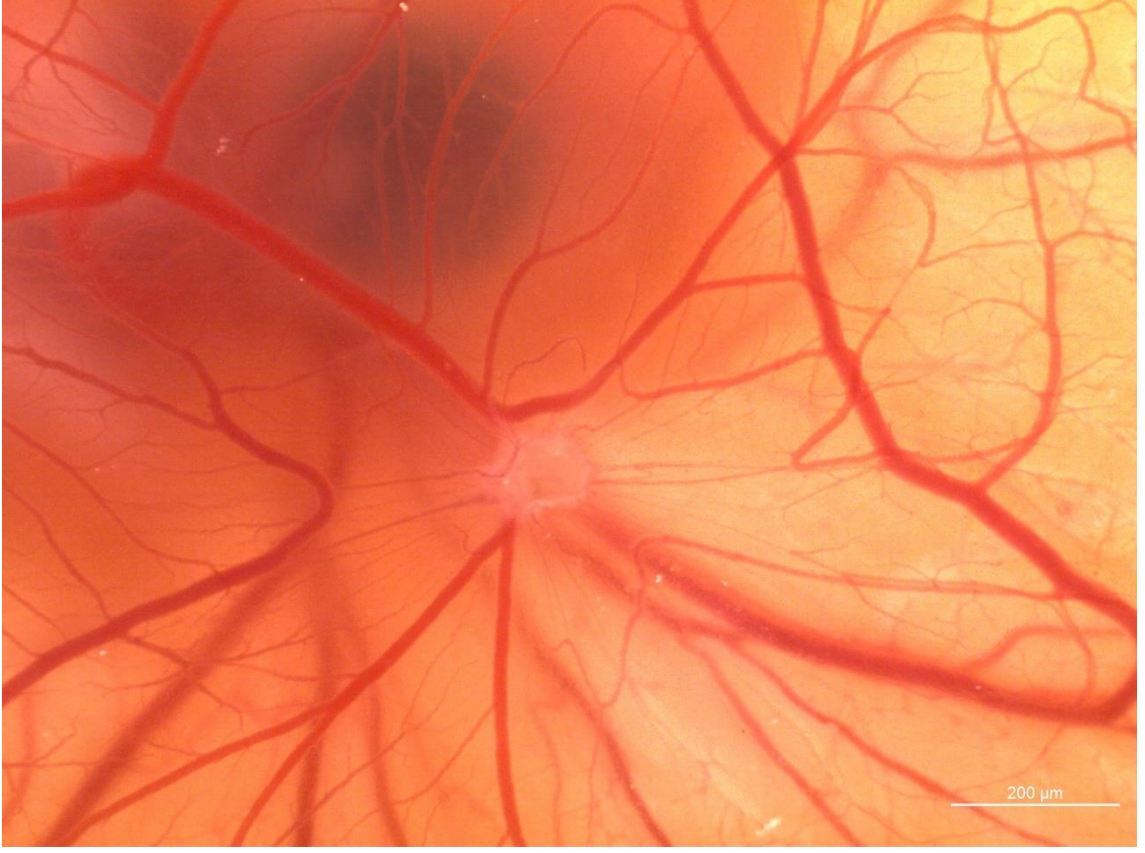
Tablo 5.13. HP ve F9-HP kodlu formülasyonun *in vivo* antiinflamatuar etki sonuçları

Test Maddesi	Konsantrasyon ($\mu\text{g.pellet}^{-1}$), jel ve boş için (embriyo^{-1})	Ortalama inhibisyon (%) *	Antiinflamatuar etki
HP	10	54.17 \pm 0.29	Çok zayıf
HP	20	62.60 \pm 0.83	Zayıf
F9-HP	10	58.33 \pm 0.29	Zayıf
F9-HP	20	76.56 \pm 12.88	Kuvvetli
F9 (Boş formülasyon)	10 μg doza eşit formülasyon	43.50 \pm 0.68	Çok zayıf
F9 (Boş formülasyon)	20 μg doza eşit formülasyon	45.00 \pm 0.73	Çok zayıf
Hidrokortizon	20	70.55 \pm 0.75	Kuvvetli
SDS	20	14.27 \pm 0.58	-
Agaroz (kör)	%2.5, a/h	-	-

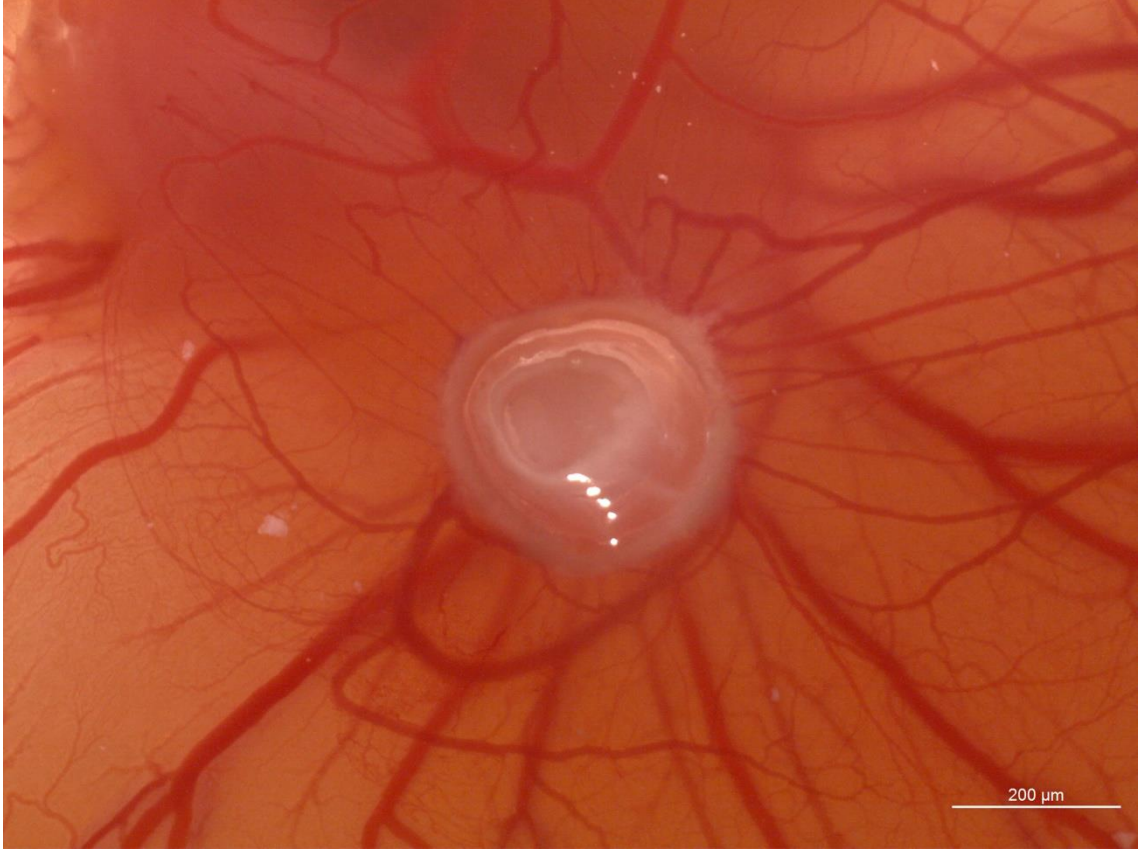
Skor değerleri ortalama skor \pm standart sapma (n = 10-15 test maddeleri için ve n = 10 standartlar için).

* $p < 0.05$, SDS ile karşılaştırılmıştır.

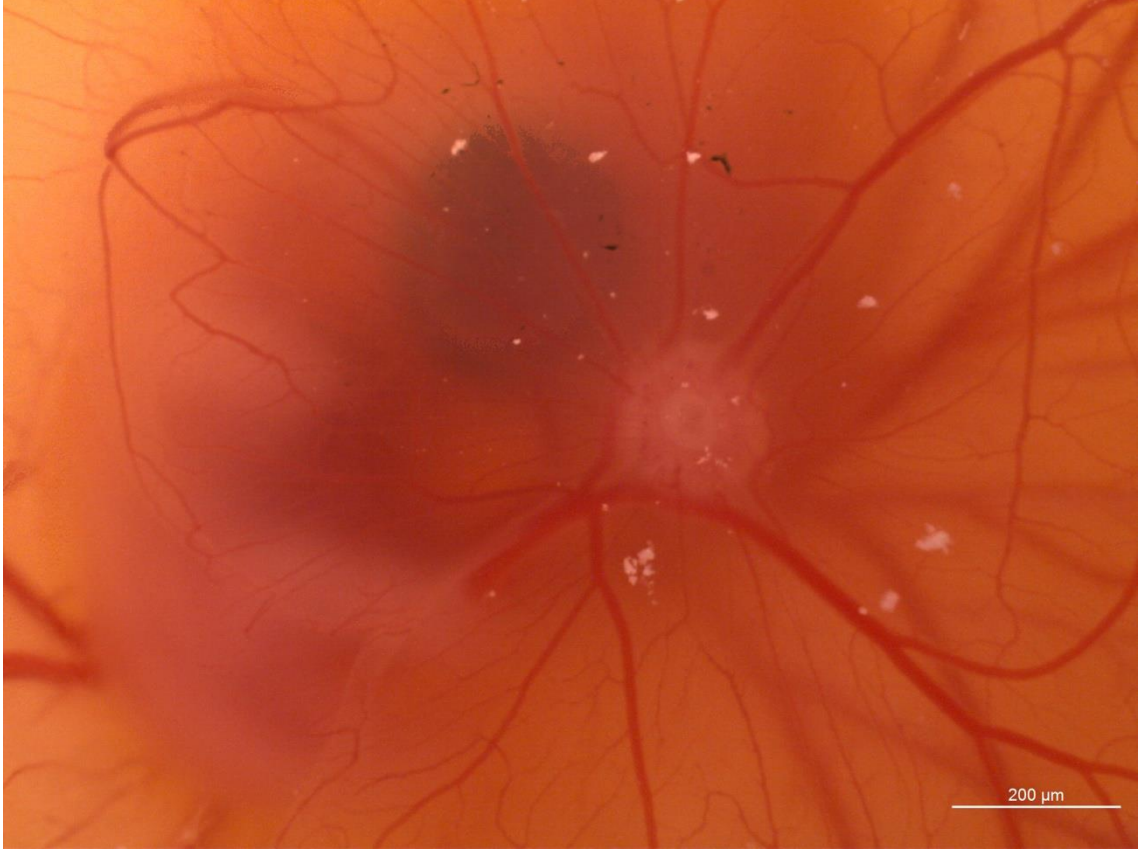
HP'nin çok zayıf antiinflamatuar etkisi (10 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$, %54.17 \pm 0.29) Şekil 5.72.'de, HP'nin zayıf antiinflamatuar etkisi (20 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$, %62.60 \pm 0.83) Şekil 5.73.'te, F9-HP kodlu jelin zayıf antiinflamatuar etkisi (10 $\mu\text{g.embriyo}^{-1}$, %58.33 \pm 0.29) Şekil 5.74'te, F9-HP kodlu jelin kuvvetli antiinflamatuar etkisi (20 $\mu\text{g.embriyo}^{-1}$, %76.56 \pm 12.88) Şekil 5.75.'te, F9'un (Boş formülasyon) çok zayıf antiinflamatuar etkisi (10 $\mu\text{g.embriyo}^{-1}$, %43,50 \pm 0,68) Şekil 5.76.'da, F9'un (Boş formülasyon) çok zayıf antiinflamatuar etkisi (20 $\mu\text{g.embriyo}^{-1}$, %45.00 \pm 0.73) Şekil 5.77.'de; Hidrokortizon'un kuvvetli antiinflamatuar etkisi (20 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$, %70.55 \pm 0.75) Şekil 5.78.'de, SDS'nin iritan ve inflamatuvar etkisi (20 $\mu\text{g.pellet}^{-1}$) Şekil 5.79.'da, Agaroz ile normal embriyo gelişimi (% 2.5, a/h) Şekil 5.80.'de sunulmuştur.



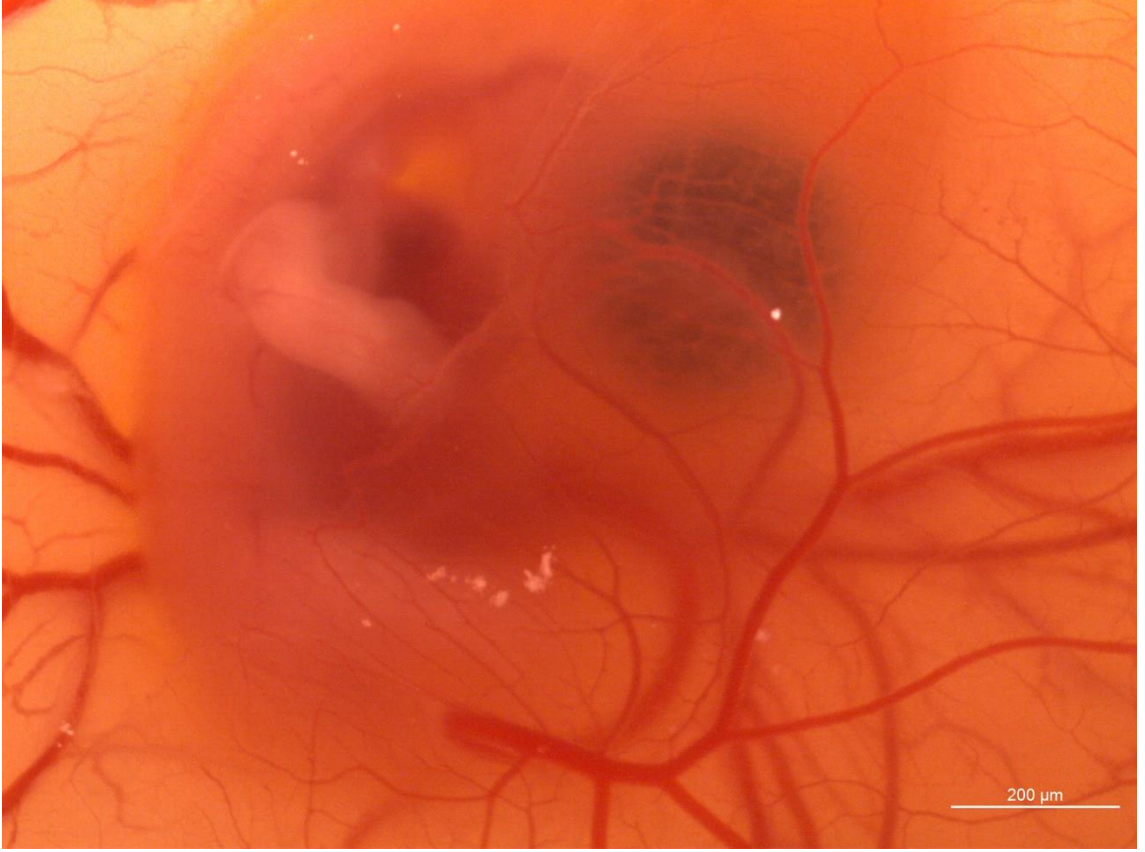
Şekil 5.72. *HP metanol ekstresinin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuar etkisi-1. * HP'nin çok zayıf antiinflamatuar etkisi (10 µg.pellet¹, %54.17 ± 0.29)*



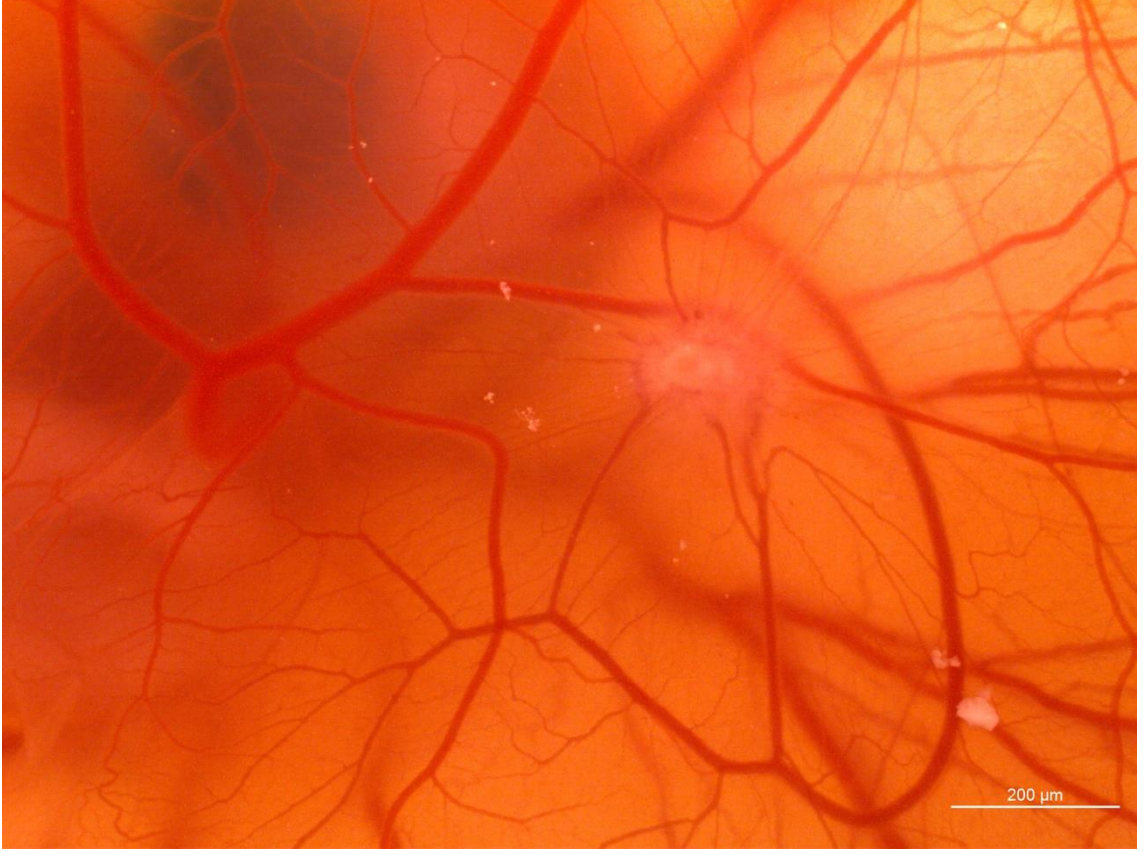
Şekil 5.73. *HP metanol ekstresinin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-2. *HP'nin zayıf antiinflamatuvar etkisi (20 µg.pellet⁻¹, %62.60 ± 0.83)*



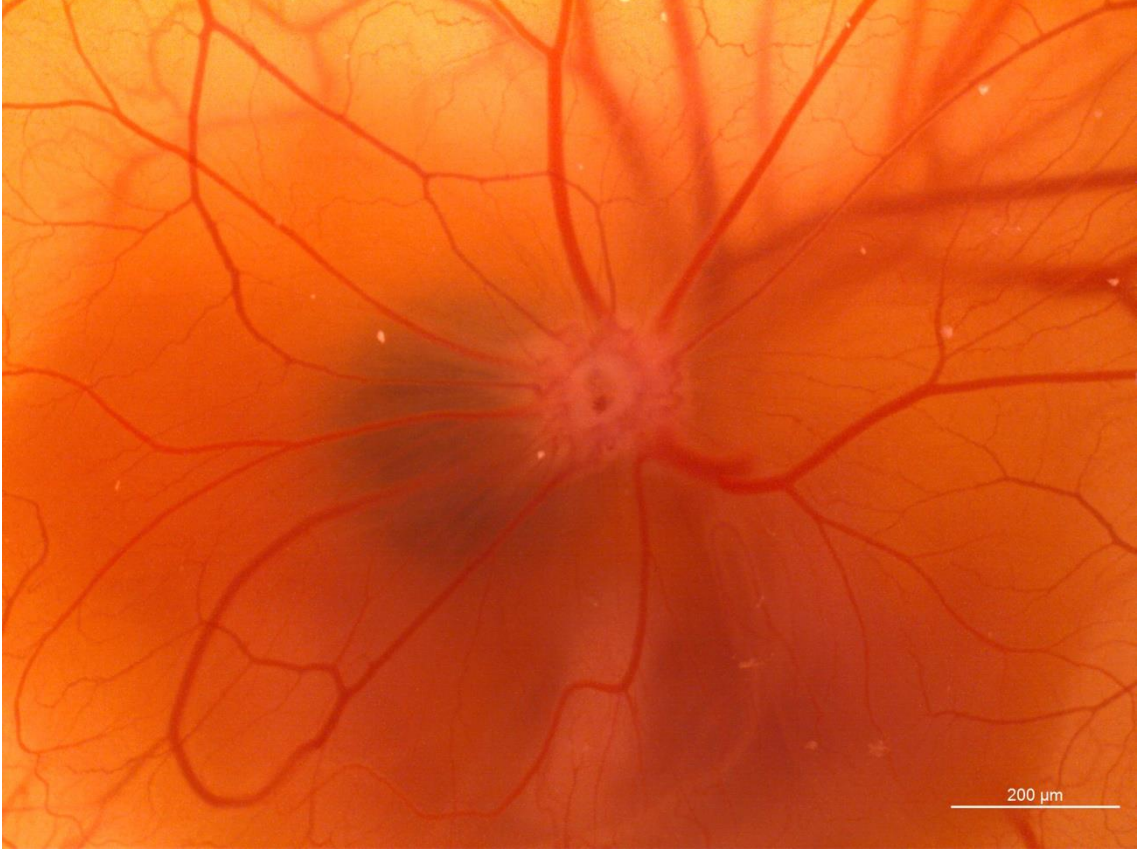
Şekil 5.74. *F9-HP kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-1. *F9-HP kodlu jelin zayıf antiinflamatuvar etkisi ($10 \mu\text{g.embriyo}^{-1}$, $\%58.33 \pm 0.29$)*



Şekil 5.75. *F9-HP kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuvar etkisi-2. *F9-HP kodlu jelin kuvvetli antiinflamatuvar etkisi (20 µg.embriyo⁻¹, %76.56 ± 12.88)*



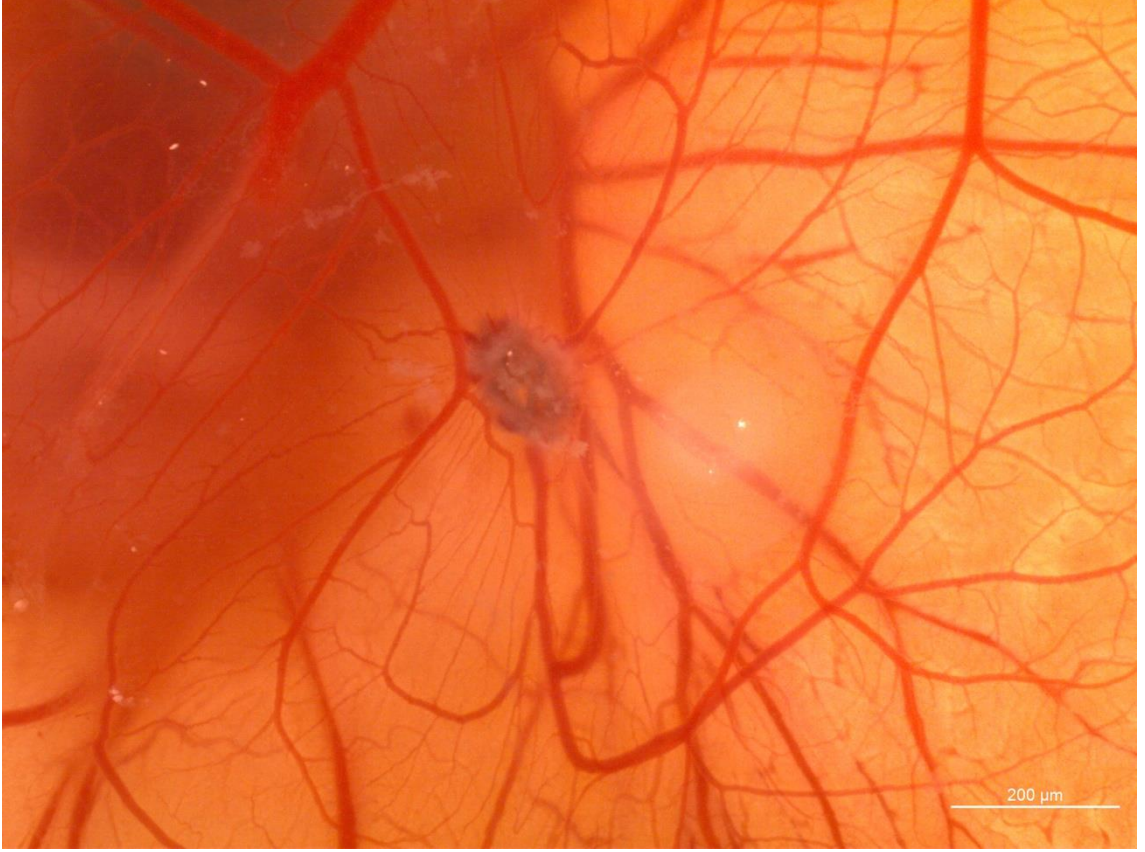
Şekil 5.76. *F9 kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuar etkisi-1. *F9'un (Boş formülasyon) çok zayıf antiinflamatuar etkisi ($10 \mu\text{g.embriyo}^{-1}$, $\%43,50 \pm 0,68$)*



Şekil 5.77. F9 kodlu jelin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuar etkisi-2. *F9'un (Boş formülasyon) çok zayıf antiinflamatuar etkisi ($20 \mu\text{g.embriyo}^{-1}$, $\%45.00 \pm 0.73$)



Şekil 5.78. Hidrokortizon'un CAM üzerinde *in vivo* antiinflamatuvar etkisi. *Hidrokortizon'un kuvvetli antiinflamatuvar etkisi ($20 \mu\text{g.pellet}^{-1}$, $\%70.55 \pm 0.75$)



Şekil 5.79. *SDS'nin CAM üzerinde in vivo antiinflamatuar etkisi. *SDS'nin iritan ve inflamatuvar etkisi (20 µg.pellet¹)*



Şekil 5.80. *Agaroz ile normal embriyo gelişimi (%2.5, a/h)*

6. TARTIŞMA

6.1. Formülasyonların hazırlanması ve karakterizasyonu

Kitosanın birçok formda işlev görme yeteneği nedeniyle, ortopedik ve periodontal uygulamalar, doku mühendisliği, yara iyileştirme ve ilaç salım sistemleride dahil olmak üzere tıp endüstrisinde birçok ilgi alanına sahiptir. Kitosan; yapay deri, cerrahi dikişler, yapay kan damarları, kontrollü ilaç salımı, kontakt lens, göz suları, bandajlar, süngerler, yanık pansumanları, kan kolesterol kontrolü, anti-inflamatuvar etki, tümör inhibisyonu, antiviral etki, plak inhibisyonu, kemik iyileşmesi tedavisi, yara iyileşmesini hızlandırıcı, hemostatik ajan, antibakteriyel ajan, mantar önleyici ajan, kilo verme etkisi gibi etkileri ve yapıları ile biyomedikal alanda oldukça popülerdir (Ibrahim ve El-Zairy, 2015). Bu önemli özelliklerinden dolayı çalışma kapsamında jel yapıcı ajan olarak kitosan tercih edilmiştir.

Kitosan ile yapılan bir çalışmada, jel formülasyonları, %1 (*a/h*) kitosan (Kitosan-H, molekül ağırlığı: 1.400.000; deasetilasyon derecesi (DA) %80) ve %15 (*a/h*) metronidazol benzoat, %1 laktik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır. Mekanik karıştırma yoluyla hazırlanan jellerde, %1 konsantrasyonda kullanılan kitosan jelin, uygulanabilirlik açısından uygun reolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Akıncıbay vd., 2007).

Bir başka kitosan jel çalışmasında öncelikle gerekli suyun yarısına buzlu asetik asit (%0.5 *a/h*) ilave edilmiş ardından tam tartılmış kitosan çözeltiye döküldükten sonra şişmeye bırakılmıştır. Şişme işleminden sonra kalan miktar su ilave edilerek karıştırılmıştır. Jel uygulamadan önce hava kabarcıklarını gidermek için bir gece oda sıcaklığında tutulmuştur. Jelin pH değeri 5.32 olarak ölçülmüş ve kitosan jeli hazırlandıktan sonra gerekli miktarda EGF solüsyonu eklenmiş ve nihai konsantrasyon $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmuştur. İlgili çalışmada kitosanın moleküler aralığı 650.000 olarak belirtilmiş ve %2'lik kitosan çözeltisinin viskozite değeri 25°C'de 7903 mPa olarak ölçülmüştür (Alemdaroğlu vd., 2006).

Başka bir çalışmada ise jeller, %2 (*a/h*) yüksek, orta veya düşük moleküler ağırlıklı kitosan, %1 (*h/h*) sulu asetik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır. Test edilen numunelere koruyucu olarak metil paraben sodyum tuzu (%0.1, *a/a*) eklenmiştir. Numuneler karıştırılmış ve elde edilen jel çözeltileri, hava kabarcıklarını gidermek için sonikasyona tabi tutulmuştur (Alsarra, 2009).

Literatür araştırması sonrası boş jel formülasyonları, farklı oranlarda (%0.5 *a/h*, %1.0 *a/h*, %1.5 *a/h*) yüksek (HMW), orta (MMW) veya düşük (LMW) moleküler ağırlıklı kitosan, %1 (*h/h*) sulu laktik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır.

6.1.1. Formülasyonların fiziksel görünüşünün değerlendirilmesi

Boş jellerde saf, pürüzsüz, berrak ve kitosandan kaynaklı hafif sarı bir görüntü elde edilmişken (Bkz. Şekil 5.1. ve Şekil 5.2), HP metanol ekstresi içeren kitosan jellerde, HP metanol ekstresi kaynaklı daha sarımsı bir görüntü elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.). Hazırlanan HP metanol ekstresi içeren jellerin pürüzsüz olması, topikal kullanıma uygunluğunu göstermiştir. HP metanol ekstresi içeren jellerin görsel ve akış olarak makroskopik olarak incelenmesi ardından farklı özellikler fark edilmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı kitosan'ın %0.5 (*a/h*), %1.0 (*a/h*) ve %1.5 (*a/h*) konsantrasyonları ile hazırlanan F1, F1-HP, F2, F2-HP, F3 ve F3-HP kodlu formülasyonlar ile orta moleküler ağırlıklı kitosan'ın %0.5 (*a/h*), %1.0 (*a/h*) ve %1.5 (*a/h*) konsantrasyonları ile hazırlanan F4, F4-HP, F5, F5-HP, F6 ve F6-HP kodlu formülasyonlarda düşük viskozite gözlenmiştir. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan'ın %0.5 (*a/h*), %1.0 (*a/h*) ve %1.5 (*a/h*) konsantrasyonları ile hazırlanan F7, F7-HP, F8, F8-HP, F9 ve F9-HP kodlu formülasyonlarda ise en iyi viskozite ve akış özelliği yüksek moleküler ağırlıklı kitosan'ın %1.5 (*a/h*) konsantrasyonu ile hazırlanmış olan F9 ve F9-HP kodlu formülasyonlarda gözlenmiştir.

6.1.2. Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi

Vücut cilt yüzeyinin (*Stratum corneum*-SC) normal pH değeri asidiktir. Normal ciltte pH, 4.1-5.8 aralığındadır. Yüz, gövde ve ekstremiteler arasında küçük pH farklılıkları gözlenebilmektedir (Lambers vd., 2006; Segger vd., 2008). En yüksek pH değerlerinin çeneye ait olduğu bildirilmiştir (pH 5.6). En asidik pH değerine sahip alanlar, alın (pH 4.4) ve üst göz kapağıdır (pH 4.6). Önkol volar, burun, boyun, nazolabial kıvrım, yanak ve perioral bölgenin pH değerleri bu değerler arasındadır (Marrakchi ve Maibach, 2007). Fizyolojik boşluklar olan koltuk altı, kasık, parmak araları ve anüste pH değerleri 6.1 ile 7.4 arasındadır. Artan pH, farklı bir mikrobiyomu teşvik eder ve bu nedenle bu alanlar enfeksiyon ve egzama reaksiyonlarına eğilimlidir. Sabunlar, deterjanlar gibi dış etkenler, ancak daha da önemlisi, kalıcı ürünler (örneğin kozmetikler veya topikal tıbbi ürünler) cilt yüzeyinin normal pH değerini değiştirebilir (Proksch, 2018).

Deri yüzeyinin asidik pH değeri, SC homeostazının ve bariyer geçirgenliğinin korunması için düzenleyici bir faktör olarak kabul edilmektedir. Asidik pH değerinin en önemli işlevleri, keratinosit farklılaşma süreci, epidermal lipidlerin ve korneosit lipid zarfının oluşumu ve işlevi, cilt mikrobiyomunun korunması ve sonuç olarak cilt rahatsızlıkları ve hastalıkları ile ilgili görünmektedir. Topikal ürünlerin asitleştirilmesi, normal cilt pH değerine uygunluğu ve 4 ile 6 arasında pH değerine sahip olması gerektiği konusunda yüksek düzeyde bir anlaşma bulunmaktadır (Lukić vd., 2021).

Literatür taraması yapıldığında normal cilt pH değeri aralığında formülasyonların hazırlanması için pH ayarı yapıldığı ya da hazırlanan formülasyonların pH değerinin normal cilt pH aralığına sahip olanların optimum seçildiği görülmektedir (Barradas vd., 2018; B. C. Lee vd., 2019; Lukic vd., 2021; Silva vd., 2014).

Optimizasyon çalışması öncesinde hazırlanan F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 ve F9 kodlu boş jellerde sırasıyla 2.88 ± 0.01 , 3.16 ± 0.03 , 3.59 ± 0.01 , 2.90 ± 0.00 , 3.22 ± 0.00 , 3.56 ± 0.01 , 2.98 ± 0.02 , 3.17 ± 0.04 ve 3.39 ± 0.08 olarak elde edilen pH değerleri cilt yapısında iritasyona neden olabilecek değerlerde bulunmuştur (Bkz. Şekil 5.5.). Ayarlama yapıp yapılmamasına gerek olup olmadığı belirlemek için HP içeren jeller hazırlanmış ve F1-HP, F2-HP, F3-HP, F4-HP, F5-HP, F6-HP, F7-HP, F8-HP ve F9-HP kodlu HP içeren jellerde sırasıyla 2.97 ± 0.01 , 3.26 ± 0.02 , 3.56 ± 0.02 , 2.91 ± 0.00 , 3.26 ± 0.01 , 3.57 ± 0.03 , 2.95 ± 0.00 , 3.21 ± 0.03 ve 3.48 ± 0.05 olarak elde edilen pH değerleri sebebiyle hazırlanan formülasyonlarda pH ayarı yapılması gerektiğini ortaya koymuştur (Bkz. Şekil 5.6.).

Hazırlanan ve sodyum bikarbonat ile pH ayarı yapılan F1-HP, F2-HP, F3-HP, F4-HP, F5-HP, F6-HP, F7-HP, F8-HP ve F9-HP kodlu HP metanol ekstresi içeren jellerde sırasıyla 4.24 ± 0.10 , 4.39 ± 0.00 , 5.52 ± 0.01 , 3.38 ± 0.01 , 4.37 ± 0.01 , 5.33 ± 0.02 , 3.95 ± 0.01 , 4.71 ± 0.03 ve 5.67 ± 0.02 olarak elde edilen pH değerleri elde edilmiştir. Cilt normal pH değeri dikkate alındığında pH ayarı sonrası F1-HP, F2-HP, F3-HP, F5-HP, F6-HP, F8-HP ve F9-HP kodlu formülasyonların sahip olduğu pH değerleri uygun görülmektedir (Bkz. Şekil 5.7.). Makroskopik ve fiziksel incelemeler sonrası en iyi viskozite ve akış özelliği formülasyon olan F9-HP, pH değeri de dikkate alındığından optimum olarak tercih edilmiş ve geri kalan çalışmalar F9-HP üzerinden yürütülmüştür (Lukic vd., 2021; Lukić vd., 2021).

6.1.3. Formülasyonların reolojik davranışının belirlenmesi

Reolojik davranış belirleme çalışmalarında, ilk aşama reolojik verilerin toplanarak, sistemin hangi tip akış davranışı gösterdiğinin belirlenmesidir. Ardından, elde edilen verilerin matematiksel modellerden birine uyumu araştırılmaktadır. Hesaplanan veriler ve ürün davranışı arasında bir korelasyon kurulabiliyorsa, daha ileriki safhalarda reolojik parametreler ürünün performans ve davranışının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Yazan, 2002).

Reolojik ölçümlerde kullanılan cihazlar çok çeşitlilik göstermektedir. En önemli avantajı çok az örnekle bile çalışmaya imkan veren koni-plak viskozimetreler reolojik özelliklerin incelenmesinde sıklıkla kullanılan bir cihaz çeşididir ve literatür incelendiğinde bu tip cihazla günümüzde hala çalışıldığı görülmektedir (Khaing vd., 2022; Sobral-Souza vd., 2022; Sweeney vd., 2022; Tavares vd., 2022).

Yapılan reolojik incelemelerde kayma gerilimi arttıkça viskozitenin azaldığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.8., Şekil 5.14., Şekil 5.20). Daha önce yapılan bir jel formülasyonu çalışmasında kayma gerilimi ile viskozite arasında ters bir ilişki olduğunu gösteren reogramlar gösterilmiştir. İlgili çalışmada kayma gerilimindeki artış viskoziteyi azaltmıştır. Hazırlanan jellerin reolojik incelemesinde viskozite azalması nedeniyle, hazırlanan jellerin Newton tipi olmayan psödoplastik akış davranışı gösterdiği belirtilmiştir (Bimbrawh vd., 2022). Literatür bilgisi göz önüne alındığında bu çalışma kapsamında hazırlanan F9-HP kodlu jelin psödoplastik akış gösterdiği söylenebilir.

F9-HP kodlu formülasyonun akış tipi belirlendikten sonra hangi akış modeline uygun olduğu incelemesi yapılmıştır. Bu amaçla kayma gerilimi-kayma hızı verilerine dayalı farklı reolojik akış modelleri, reometre ile sağlanan yazılım kullanılarak test edilmiştir. Model incelenmesinde sürtünme katsayıları (CoF) değerleri incelendiğinde üç ölçümün ortalaması olarak Bingham, Casson ve Power law modelleri için sırasıyla 96.867 ± 1.350 , 99.033 ± 0.569 ve 98.700 ± 0.794 değerleri elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.11., Şekil 5.12., Şekil 5.13., Şekil 5.17., Şekil 5.18., Şekil 5.19., Şekil 5.23., Şekil 5.24. ve Şekil 5.25.). Matematiksel sonuçlardan ve şekillerden anlaşıldığı üzere Casson ve Power law modellerde daha yüksek CoF değerleri elde edilmiş ve bu iki değer arasında yüksek korelasyon tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 5.12., Şekil 5.13., Şekil 5.18., Şekil 5.19., Şekil 5.24. ve Şekil 5.25.). Sonuç olarak standart sapma temelinde seçilen en uygun modellerin Casson ve Power-law modeli olarak bulunduğu ve Şekil 5.8., Şekil 5.14., Şekil

5.20 incelendiğinde psödoplastik akış gösteren bir sistem olduğu düşünüldüğünde en uygun akış modelinin Power-law olduğu söylenebilir.

Bingham ve Casson modelleri plastik sistemleri akma değerine sahip olarak tanımlarken, Power-law modeli psödoplastik (kayma ile incelen / shear thinning) sistemler için en uygun modeldir (Abdel-Hamid vd., 2006). F9-HP kodlu jel formülasyonu için en uygun model, bu formülün görünür bir akma değeri göstermediğini ortaya koyan ve psödoplastik akışın özelliği olan düşük gerilim değerlerinde akışa karşı sınırlı direnci gösteren Power-law modeli olduğu söylenebilir. Bu kayma ile incelleme davranışı, uygulama sırasında ince, aksi takdirde kalın/katı olması gerektiğinden, topikal preparatlar için arzu edilen bir özelliktir (Abdel-Hamid vd., 2006).

6.1.4. *Helichrysum pampylicum* metanol ekstresinin analitik validasyon çalışması

Yasal gerekliliklerin ötesinde, analitik yöntemlerin performansı ve güvenilirliği, farmasötik dozaj formlarının kalite kontrolü için esastır. Validasyon özellikleri ve resmi ve bilimsel literatürde sunulan kılavuzların gereklilikleri temelinde, her analitik metod, performansı ile ilgili parametrelere göre valide edilmelidir. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik gibi parametreler deneysel doğrulama için değerlendirilmelidir (Baby vd., 2006).

Sıvı kromatografisi, kılcal elektroforez, florimetri, kemilüminesans ölçümü, türev spektrofotometrisi ve kütle spektrometrisi örnek ölçmek için analitik araçlar olarak tanımlanmıştır, ancak UV-spektrofotometri rutin kullanım için çeşitli avantajlar sunar. Bunlar basitlik, hız, hassasiyet, ekipmanın bulunabilirliği ve nispeten düşük reaktif maliyetleridir (Baby vd., 2006; Rolim vd., 2006).

Literatür incelendiğinde avokado kabuğu ekstresi (Cerde-Opazo vd., 2021), *Pterocarpus marsupium* Roxburgh ekstresi (Manne vd., 2021), *Agrimonia eupatoria* L. ekstresi (Mouro vd., 2020), *Clitoria ternatea* yaprak ekstresi (Chen vd., 2020), kakule ekstresi (Nejat vd., 2017), nar ekstresi (Badawi vd., 2020) ve zencefil ekstresi (Abo Mansour vd., 2021) içeren ilaç formülasyonlarının yapıldığı çalışmalarda UV-spektrofotometri yöntemi hem ilaç/ekstre miktar tayininde hem de *in vitro* dissolüsyon çalışmalarında, örnek analizlerinde başarıyla kullanıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada, formülasyonlardaki HP miktarının belirlenmesi ve *in vitro* dissolüsyon çalışması için öncelikle HP'e ait analitik bir yöntem geliştirilmiştir. 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda HP çözeltilisinin UV aralığında (200-400 nm) taranmasıyla elde edilen maksimum absorbans 308 nm olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 5.27. ve Şekil 5.29) ve *in vitro* dissolüsyon ortamı olarak kullanılacak PBS pH 5.5 (Bkz. Şekil 5.30.), HP içermeyen boş formülasyon (F9) (Bkz. Şekil 5.31.) 308 nm’de herhangi bir absorbans vermemiştir. Bu durum yöntemin seçiciliğini kanıtlamaktadır (Rapalli vd., 2020).

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen $y = 0.0099x + 0.0011$ olan regresyon denkleminin korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9999 olarak hesaplanmıştır. Literatür ve yasal kılavuzlar incelendiğinde R^2 değerinin 1'e yakın (kabul edilebilir minimum korelasyon katsayısı kriteri, $R^2 = 0.99$ 'dan büyük olmalıdır) olması istenmekte ve bu değer yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Borman ve Elder, 2017; Enggi vd., 2022; Guideline, 2005; Miguez vd., 2022). Bu bilgi doğrultusunda, bu çalışmada 0.9999 olarak elde edilen R^2 değeri yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Bkz. Şekil 5.28.).

Üç gün boyunca yapılan kesinlik çalışması sonucunda $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki HP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla %0.620, % 0.620 ve %0.233 (Bkz. Tablo 5.2); $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki HP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla %0.440, %1.773 ve %0.872 (Bkz. Tablo 5.3); $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki HP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla %0.449, %1.647 ve %0.259 (Bkz. Tablo 5.4); olarak elde edilen RSD (%) değerleri %2'den düşüktür. HP'in her bir kesinlik seviyesinde üç tekrarlı çözeltilisi için hesaplanan %RSD'nin %2'den az olduğu tespit edildiğinden, yöntemin kesin olduğu sonucuna varılmıştır (Abdelazim vd., 2022).

Doğruluk çalışmasında $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon için sırasıyla 99.392 ± 0.608 , 99.629 ± 0.371 ve 99.686 ± 0.314 olarak elde edilen geri kazanımlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 5.5.) (Farid vd., 2022).

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde HP için seçici, basit ve ucuz bir yöntem geliştirildiği söylenebilir.

6.1.5. Formülasyonlardaki *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi miktarının belirlenmesi

Birinci ölçüm sonunda elde edilen 99.29 ± 0.16 değeri, ikinci ölçüm sonucunda elde edilen 96.60 ± 0.19 değeri ve üçüncü ölçüm sonucunda elde edilen 100.60 ± 0.19 değerinin ortalaması 98.83 ± 0.19 bulunmuştur ve bu değer F9-HP kodlu formülasyona yüksek oranda HP yüklendiğini kanıtlar niteliktedir.

6.1.6. *In vitro* dissolüsyon çalışması

Kitosan jel formülasyonundan EGF'nin bir *in vitro* dissolüsyon analizinin yapıldığı bir çalışmada, $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyona sahip 1 mL kitosan jel-EGF formülasyonu, gözenek boyutu 12.000 Da olan bir diyaliz kesesine yerleştirilmiş ve kese, 15 kat daha yüksek hacim içeren sürekli karıştırılan 32 ± 0.5 °C'de PBS (pH 5.8) ortamı bulunan bir alıcı kaba daldırılmıştır. Belirlenen periyotlarda numune (3 mL) alıcı kaptan çıkarılmış ve taze tampon ile doldurulmuştur. Numuneler belirlenen aralıklarda alınmış ve sonra bir UV spektrofloreometre kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmada hazırlanan kitosan jelden EGF salınımının 24 saat sonunda 97.3 olduğu bildirilmiş ve jel formülasyonundan salım kinetiğinin birinci derece olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar jelden EGF salım hızının zamanla değiştiğini gösterir şeklinde yorumlanmıştır. İlgili çalışmada verilen dissolüsyon grafiği incelendiğinde EGF'nin yaklaşık ~ 80 'i ilk 500 dakikada (~ 9 saat) kitosan jelden salınmış ve ardından yavaş salım gözlenmiştir (Alemdaroğlu vd., 2006).

Moleküler ağırlığın ve kitosan konsantrasyonunun selekoksib salım profilleri üzerindeki eşzamanlı etkisini incelemek için, dört saatlik bir süre boyunca çeşitli kitosan jel formülasyonlarından ilacın salım yüzdesi hesaplandığı bir çalışmada, orta moleküler ağırlıklı (MMW) kitosan konsantrasyonunun 1.0 'dan (*a/h*) 3.0 'a (*a/h*) yükseltilmesi, salınan ilaç yüzdesinin azalmasıyla sonuçlanmıştır. 1.0 (*a/h*) jel formülasyonu ile 75 ± 2.2 selekoksib salım oranı elde edilmişken 2.0 (*a/h*) kitosan jeli için ilacın salınma yüzdesi 66 ± 1.8 olarak elde edilmiştir. Kitosan konsantrasyonun 3.0 'e (*a/h*) yükseltildiğinde ise ilacın yüzdesi 56 ± 1.5 olmuştur (El-Badry ve Fetih, 2011).

Aynı çalışmada jel formülasyonlarından selekoksib salımı üzerindeki kitosan moleküler ağırlığının etkisi ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Kullanılan jel oluşturucu kitosanın tüm moleküler ağırlıklarında jel formülasyonu içindeki konsantrasyonu 2.0 (*a/h*) olarak belirlenmiştir. Kullanılan kitosanın moleküler ağırlığı ile hazırlanan jellerden

ilacın salım yüzdesi arasında ters orantılı bir ilişki elde edilmiştir. Yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) kitosan için, ilaç salımı 52 ± 2.2 olarak elde edilmişken, orta (MMW) ve düşük (LMW) molekül ağırlıklı dereceler için ilaç salımı 66 ± 1.8 ve 71 ± 1.5 olarak elde edilmiştir. Salım testinin sonuçları, kitosan konsantrasyonunun veya kitosan moleküler ağırlığının arttırılmasının, jellerin daha yüksek viskoziteye yükseldiği ve yüksek viskoziteden dolayı suyun penetrasyon hızı azaldıkça ilacın salımını azalttığı şeklinde yorumlanmıştır (El-Badry ve Fetih, 2011).

Lizostafin içeren kitosan (Moleküler ağırlık: 100–150 kDa; asetilasyon derecesi: %85) jellerin hazırlandığı başka bir çalışmada kitosan jelden salınan lizostafin ölçmek için, 100 mg lizostafin yüklü kitosan jelle 100 µL distile su ilave edilmiş ve jel süspansiyonu 37°C'de çalkalamalı su banyosunda tutulmuştur. 0, 3, 6, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde numuneden 10µL süpernatant toplanmış ve toplanan jel süspansiyonu 5000 RPM'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Farklı zaman aralıklarında toplanan süpernatant, Bradford tahlili ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, lizostafin içeren kitosan jelden lizostafin'in ilk 12 saatte %50'den fazlası, 24 saat içinde %95 oranında salındığı şeklinde belirtilmiştir (Nithya vd., 2018).

Seyreltik laktik asit çözeltisinde (%2 a/a) lidokain hidroklorür içeren kitosan jellerin hazırlandığı bir çalışmada lidokain hidroklorür'ün farklı moleküler ağırlıkta kitosan ile hazırlanan jellerden salımı, diyaliz selüloz asetat membranı kullanılarak belirlenmiştir. İlgili çalışmada yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan farklı jellerde jellerde ilk 6 saatte %70 ile %90 oranında lidokain hidroklorür salımı görüldüğü bildirilmiştir (Varshosaz vd., 2006).

Yapılan bu çalışmada HP, pH 5.5 PBS ortamında 1. saatin sonunda 79.838 ± 3.095 , ikinci satın sonunda ise 97.397 ± 2.086 salım oranı göstermiştir. 3. saat sonunda 100.348 ± 1.373 salım oranı ile HP'nin tamamı pH 5.5 PBS ortamında salınmıştır (Bkz. Tablo 5.7.). HP içeren F9-HP koldu kitosan jel formülasyonundan HP salım oranlarına abkıldığında 3. saat sonunda, 55.278 ± 5.385 miktarlarında HP salım oranı gözlemlenmiştir. F9-HP koldu kitosan jel formülasyonundan HP salımı 9. saat sonunda 99.867 ± 1.969 olarak elde edilmiş ve HP'nin tümü F9-HP koldu kitosan jel formülasyonundan salınmıştır (Bkz. Tablo 5.7.). Literatüre uygun olarak F9-HP kodlu formülden HP salımı, saf HP ile karşılaştırıldığında F9-HP kodlu formülasyonun daha

yavaş ve 9 saatlik bir uzatılmış salım yaptığı oldukça açıktır (Bkz. Şekil 5.33.-Şekil 5.34.).

6.1.7. Salım Kinetiği

Salım oranları ve kümülatif salım profilleri elde edildikten sonra, salım kinetiğini belirlenmesi açısından en önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için veriler DDSolver programına aktarılmıştır. Bu dört kriter Akaike bilgi kriteri (AIC), korelasyon katsayısı (r^2), düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$) ve Model seçme kriteri (MSC) kriter olarak belirlenmiştir. Değerlendirmede en yüksek r^2 , $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değeri baz alınmıştır. Programda Sıfıncı-derece, Sıfıncı-derece (T_{lag}), Sıfıncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3, Weibull 4, Logistic 1, Logistic 2, Logistic 3, Gompertz 1, Gompertz 2, Gompertz 3, Gompertz 4, Probit 1 ve Probit 2 modelleri incelenmiştir (Zhang vd., 2010; Zuo vd., 2014).

İlaçların çözünmesi, salınması ve salım kinetikleri; tabletler, kapsüller gibi katı dozaj formları, kremler, merhemler ve implantlar gibi yarı katı dozaj formları için ilaçları saatler, haftalar ve yıllar arasında değişen amaçlanan zaman periyodu boyunca veren önemli bir olgudur. Sürekli, gecikmeli, kontrollü salımlı dozaj formları ve yeni ilaç dağıtım sistemi gibi her türlü değiştirilmiş salımlı dozaj formlarının tasarımı ve optimizasyonu için de geçerlidir (Paarakh vd., 2018). İlaçların taşıyıcı sistemden salınmaları, vücut sıvılarının sistemlere girerek iç katmanlara ulaşması ve ilaç ile sıvının reaksiyona girmesi ve böylece molekülün sistem yüzeyine hareket etmesi ve dozaj formundan tam geçişi ile sağlanır. Mekanistik matematik teorileri, difüzyon, çözünme, şişme, erozyon, çökeltme ve/veya bozunma gibi gerçek olaylara dayanır (Frenning ve Strømme, 2003; Lemaire vd., 2003; Narasimhan, 2001).

Tablo 5.8 incelediğinde F9-HP kodlu formülasyon için ilk 6 saatte Korsmeyer-Peppas ve Peppas-Sahlin modelleri arasında yüksek korelasyon elde edilmiştir. Elde edilen bu korelasyon yüksek moleküler ağırlıklı kitosan ile hazırlanan sistemlerin tek bir salım mekanizmasının olmadığı birden fazla mekanizma ile salım yaptığının

göstergesidir. (Zhang vd., 2010). İlaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde salımının birden fazla modele uyabileceği daha önce literatürde bildirilmiştir (Öztürk ve Kıyan, 2020; H. Yang vd., 2019).

Modeller arasında yüksek korelasyon gözlemlendiği için özellikle Korsmeyer-Peppas modelinde 'n' değeri, ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyon üssüdür. Salım mekanizmasıyla ilgili olan n değeri farklı değerler ve aralıklarda olabilir. Bu değer ve aralıklar şu şekilde olabilir; $n < 0.5$, $n = 0.5$, $0.5 < n < 1.0$, $n = 1$ ya da $n > 1.0$. Eğer $n < 0.5$ ise ilaç taşıyıcı sistemin yarı-fickian difüzyon mekanizması ile salım yaptığı, $n=0.5$ ise ilaç taşıyıcı sistemin fickian difüzyonu mekanizması ile salım yaptığı, $0.5 < n < 1.0$ ise ilaç taşıyıcı sistemin anomalous (fickian olmayan) difüzyon mekanizması ile salım yaptığı, $n=1$ ise ilaç taşıyıcı sistemin Fickian olmayan durum II mekanizması ile salım yaptığı ve $n > 1.0$ ise ilaç taşıyıcı sistemin Fickian olmayan süper durum II mekanizması ile salım yaptığı literatürde bildirilmiştir (Basak vd., 2006). F9-HP kodlu formülasyonun Korsmeyer-Peppas modeli için ilk 6 saatlik salım kinetiğinde n değeri 0.619 olarak gözlemlenmiştir. Bu bilgi doğrultusunda bu çalışmada hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin anomalous (fickian olmayan) difüzyon mekanizması ile salım yaptığı söylenebilir.

6.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

6.2.1. *In vitro* antioksidan aktivite çalışmaları

Antioksidan, diğer moleküllerin oksidasyonunu engelleyen bir moleküldür. Oksidasyon, elektron veya hidrojeni maddelerden oksitleyici bir ajana aktaran kimyasal bir reaksiyondur. Oksidasyon reaksiyonları serbest radikaller üretebilir. Sırasıyla bu radikaller zincirleme reaksiyonları başlatabilir, zincirleme reaksiyonlar bir hücrede meydana geldiğinde hücrede hasara veya ölüme neden olabilir. Antioksidanlar, serbest radikal ara maddelerini uzaklaştırarak bu zincir reaksiyonlarını sonlandırır ve diğer oksidatif reaksiyonları inhibe eder (Moharram ve Youssef, 2014).

Antioksidan terimi, küçük miktarlarda kolayca oksitlenebilen malzemelerin oksidasyonunu önleyebilen veya büyük ölçüde geciktirebilen maddeler veya düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda bu maddelerin oksidasyonu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddeler gibi çeşitli şekillerde tanımlanmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Antioksidanlar, organizmanın serbest radikallerin saldırısına bağlı patolojilere karşı savunma mekanizmalarından sorumludur. Bu nedenle, antioksidanlar

kanser, Parkinson, Alzehemir veya ateroskleroz gibi oksidatif strese neden olan dejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde rol oynar (Pisoschi ve Negulescu, 2011).

Etki şekline göre antioksidanlar hidrojen atomu transferi (HAT) ve tek elektron transferi (SET) deneyleri olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. HAT tabanlı testler, bir antioksidanın serbest radikalleri (genel olarak biyolojik olarak daha uygun olduğu düşünülen peroksil radikalleri) H-atom bağıışı ile söndürme kapasitesini ölçer. Çoğu SET bazlı analizde, antioksidan etki uygun bir redoks potansiyeli prob ile simüle edilir, yani antioksidanlar peroksil radikalleri yerine floresan veya renkli bir prob (oksitleyici ajan) ile reaksiyona girer (Moharram ve Youssef, 2014).

Hidrojen Atomu transfer yöntemlerine (HAT) örnek olarak Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC), lipid peroksidasyon inhibisyon kapasitesi (LPIC), toplam radikal tutucu antioksidan parametresi (TRAP), engellenmiş oksijen alımı (IOC), crocin ağartma nitrik oksit radikal inhibisyon aktivitesi, p-NDA (p-butrisidunetil anilin) ile hidroksil radikal süpürme aktivitesi, H₂O₂ radikallerin temizlenmesi, ABTS radikal süpürme ve alkali ile süper oksit radikal oluşumunun temizlenmesi (SASA) yöntemleri verilirken; elektron transfer yöntemlerine (SET) trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) renk giderme, Antioksidan gücü azaltan demir (FRAP), DPPH serbest radikal süpürücü ve Bakır(II) indirgeme kapasitesi örnek verilebilir (Frankel ve Finley, 2008). Bu çalışma kapsamında hazırlanan jellerin antioksidan etkinliklerini belirlemek için metal şelatlayıcı yöntem, ABTS yöntemi, redükleyici güç yöntemi ve DPPH serbest radikal süpürücü yöntem kullanılmıştır.

Metal şelatlayıcı yöntem sonuçlarına göre en yüksek metal şelatlayıcı antioksidan aktiviteyi F9-HP kodlu formülasyon gösterirken en düşük aktiviteyi HP metanol ekstresi göstermiştir. Kitosanın da metal şelatlayıcı antioksidan aktivitesi olduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 5.9.). ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi sonuçlarına göre BHT ve Askorbik asit ile karşılaştırıldığında en yüksek ABTS katyon renksizleştirici antioksidan aktiviteyi HP jel gösterirken en düşük aktiviteyi HP metanol ekstresi göstermiştir. Kitosanın da ABTS katyon renksizleştirici antioksidan aktivitesi var olduğu gözlemlenmiştir (Bkz. Tablo 5.10.). Redükleyici güç yöntemi sonuçlarına göre en yüksek Redükleyici gücü HP metanol ekstresi gösterirken en düşük aktiviteyi F9-HP kodlu formülasyon göstermiştir. F9 (boş formülasyon) ise etki göstermemiştir (Bkz. Tablo

5.11.). DPPH serbest radikal süpürücü yöntemi sonuçları göre en yüksek DPPH serbest radikal süpürücü antioksidan aktiviteyi HP metanol ekstresi gösterirken en düşük aktiviteyi F9-HP göstermiştir. F9 (boş formülasyon) ise etki göstermemiştir (Bkz. Tablo 5.12.) Tüm antioksidan aktivite sonuçlarına göre F9-HP kodlu formülasyon belirgin bir şekilde DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS katyon renksizleştirici ve Metal şelatlayıcı antioksidan aktivite gösterirken zayıf redükleyici antioksidan potansiyel göstermiştir. Literatür incelendiğinde kitosanın kendisinin de antioksidan etkinlikte olduğu bildirilmiştir (Guo vd., 2005; Kogan vd., 2004; Sun vd., 2004; Xie vd., 2001). Metal şelatlayıcı antioksidan aktivite ve ABTS yöntem sonuçlarında hazırlanan jellerde yüksek aktivite elde edilmesi kitosandan dolayı olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak bu çalışma kapsamında hazırlanan F9-HP kodlu formülasyon hem kitosan hem de HP ekstresi kaynaklı olarak farklı mekanizmalar ile antioksidan aktivite göstermiştir.

6.2.2. HET-CAM yöntemi ile *in vivo* anti-inflamatuvar etkinlik çalışmaları

Anjiyogenez veya neovaskülarizasyon, önceden var olan damarlardan yeni kılcal damarların oluşumu, fizyolojik olarak sağlıklı vücutta doku onarımı, yara iyileşmesi, embriyogenez ve dişi üreme sisteminde hayati bir rol oynayan fizyolojik proseslerdir (Walsh ve Pearson, 2001). Büyüme faktörleri, sitokinler, proteolitik enzimler, integrinler ve hücre dışı matris bileşenleri gibi proanjiyogenik ve antianjiyogenik araçlar arasındaki denge ile düzenlenir ve sadece daha önce belirtilen fizyolojik süreçler sırasında açılır (Bürgermeister vd., 2002). Kanser, kronik inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, diyabetik retinopati, sedef hastalığı, endometriozis ve obezite gibi patolojiler anjiyojenik dengenin bozulmasına neden olarak anjiyojenik aktivasyona neden olabilir ve patolojik olarak neovaskülarizasyon oluşabilir (Carmeliet ve Jain, 2000; Ribatti, 2005, 2008). Anjiyogenez ile inflamasyon arasındaki ilişki, daha önce iltihaplı lezyonlarda neovaskülarizasyonun tanımlanabileceği ve daha önce romatoid artrit dahil birçok inflamatuvar hastalığın histolojik bulgularından biri olabileceği bildirilmiştir (Griffioen ve Molema, 2000). Bu nedenle inflamasyon ve anjiyogenezin beraber olduğu bir proses oldukları kabul edilir (Bürgermeister vd., 2002).

HET-CAM testi çok kullanışlı, ucuz ve uygulaması basit, hem steroidale hem de nonsteroidal ajanlara duyarlıdır ve uçucu yağlar, sentetik terapötikler, ilaç formülasyonları ve kozmetikler, bitki özleri dahil olmak üzere doğal ürünlerin anti-inflamatuvar, teratojenik, olası toksik ve yan etkileri ve tahriş potansiyelini taramak için

kullanılmaktadır (D'arcy ve Howard, 1967; Hariram Nile ve Won Park, 2013; Paper vd., 2005; Ribatti, 2016; Schrage vd., 2010; Seow vd., 2014; Steiling vd., 1999). HET-CAM'in Draize tavşan gözü testi gibi deneylere tercih edilen bir *in vivo* hayvan alternatif testi olduğu bilinmektedir (Wilson ve Steck, 2000). Deneysel sürecin ilk (erken) embriyonik büyüme bölümünde, 3-7. günler arasında gerçekleşmesi nedeniyle, test prosedürü herhangi bir etik kurul onayı gerektirmez (Kue vd., 2015; Özgürtaş, 2009; Ribatti vd., 2001).

HET-CAM sonuçlarına göre HP metanol ekstresi 10 µg.pellet⁻¹ olarak kullanıldığında %54.17 ± 0.29 oranında çok zayıf antiinflamatuvar etki, 10 µg.pellet⁻¹ olarak kullanıldığında ise %62.60 ± 0.83 oranında zayıf antiinflamatuvar etkili olduğu belirlenmiştir (Bkz Şekil 5.72., Bkz Şekil 5.73. ve Bkz Tablo 5.13.). HET-CAM sonuçlarına göre F9 kodlu boş formülasyonlar 10 µg.embriyo⁻¹ ve 20 µg.embriyo⁻¹ konsantrasyonlarında sırasıyla %58.33 ± 0.29 ve %76.56 ± 12.88 oranlarında zayıf antiinflamatuvar etkinlik göstermiştir (Bkz Şekil 5.74., Bkz Şekil 5.75 ve Bkz Tablo 5.13.). Sadece kitosandan oluşan F9 kodlu jelin, HP metanol ekstresi kadar antiinflamatuvar etkinliği tespit edilmiştir.

İnflamasyon, olumsuz bir uyarana maruz kaldıktan sonra yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü yeniden sağlamak amacıyla belirli bir bağışıklık ve inflamatuvar hücre grubu tarafından bir doku bölmesinde yönlendirilen insan vücudunun enfeksiyon veya yaralanmasına karşı ilk koruyucu tepkisidir (Kim, 2018; Wang vd., 2017). Kitosan ve türevlerinin antiinflamatuvar ve proinflamatuvar özellikleri hakkında çok sayıda araştırma yapılmıştır (Chung vd., 2012; Friedman vd., 2013; Li vd., 2014, 2018; Ma vd., 2011; Oliveira vd., 2012; E.-J. Yang vd., 2010). Yapılan bir çalışmada kitosanın antiinflamatuvar aktivitesine ana katkının, molekülünü oluşturan yapısal elementler tarafından yönlendirildiği, ancak moleküler ağırlığa bağlı olmadığı sonucuna varılmıştır (Gallo vd., 2017). Bu literatür bilgileri doğrultusunda Sadece kitosandan oluşan F9 kodlu jelin antiinflamatuvar etkinliğinin olduğu doğrulanabilir.

HET-CAM sonuçlarına göre F9-HP kodlu jelde doza bağlı olarak antiinflamatuvar etkinliği değişmiştir. 10 µg.embriyo⁻¹ ve 20 µg.embriyo⁻¹ dozlarda sırasıyla zayıf antiinflamatuvar (%58.33 ± 0.29) ve kuvvetli antiinflamatuvar (%76.56 ± 12.88) etki belirlenmiştir. 20 µg.embriyo⁻¹ dozda HP metanol ekstresinin ve kitosanın Sinerjistik etki ile kuvvetli antiinflamatuvar etki gösterdiği söylenebilir.

7. SONUÇ

Bu çalışmada *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi içeren kitosan bazlı jeller başarılı bir şekilde üretilmiştir. Makroskopik ve fiziksel incelemeler sonrası en iyi viskozite ve akış özellikli formülasyon olan F9-HP, pH değeri de dikkate alındığından optimum olarak tercih edilmiş ve geri kalan çalışmalar F9-HP üzerinden yürütülmüştür. F9-HP kodlu jelin psödoplastik akış gösteren bir sistem olduğu belirlenmiştir. F9-HP kodlu jel formülasyonu için en uygun model, bu formülün görünür bir akma değeri göstermediğini ortaya koyan ve psödoplastik akışın özelliği olan düşük gerilim değerlerinde akışa karşı sınırlı direnci gösteren Power-law modeli olduğu gösterilmiştir. Bu kayma ile inceme davranışı, uygulama sırasında ince, aksi takdirde kalın/katı olması gerektiğinden, topikal preparatlar için arzu edilen bir özelliktir. *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi miktarı F9-HP kodlu kitosan bazlı jelde 98.83 ± 0.19 bulunmuştur ve bu değer F9-HP kodlu formülasyona yüksek oranda HP yüklendiğini kanıtlar nitelikte olduğu düşünülmüştür. F9-HP kodlu formülden HP salımı, saf HP ile karşılaştırıldığında F9-HP kodlu formülasyonun daha yavaş ve 9 saatlik bir uzatılmış salım yaptığı belirlenmiştir. Salım kinetiği çalışmaları doğrultusunda bu çalışmada hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin anomalous (fickian olmayan) difüzyon mekanizması ile salım yaptığı bulunmuştur. Antioksidan aktivite sonuçlarına göre F9-HP kodlu formülasyon belirgin bir şekilde DPPH serbest radikal süpürücü, ABTS^{•+} katyon renksizleştirici ve Metal şelatlayıcı antioksidan aktivite gösterirken zayıf redükleyici antioksidan potansiyel göstermiştir. HET-CAM sonuçlarına göre F9-HP kodlu jelde doza bağlı olarak artan ve 20 µg.embriyo⁻¹ dozda kuvvetli antiinflamatuvar etkinliği elde edilmiştir. 20 µg.embriyo⁻¹ dozda HP metanol ekstresinin ve kitosanın sinerjistik etki ile kuvvetli antiinflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada hem antioksidan hem de antiinflamatuvar tedavide kullanılacak *Helichrysum pamphylicum* metanol ekstresi içeren kitosan bazlı jellerin başarılı bir şekilde formüle edilip karakterize edildiği söylenebilir. Çalışmanın ileri aşamalarında farklı *in vivo* hayvan deneyleri ve insan deneyleri yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermawi, N. M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Abd El-Hakim, Y. M., & Al-Sagheer, A. A. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 2726–2744.
- Abdel-Hamid, S. M., Abdel-Hady, S. E., El-Shamy, A. A., & El-Dessouky, H. F. (2006). Formulation of an antispasmodic drug as a topical local anesthetic. *International Journal of Pharmaceutics*, *326*(1–2), 107–118.
- Abdelazim, A. H., Ramzy, S., Abdelzaher, A. M., & Shahin, M. (2022). Comparative evaluation of different mathematical models for simultaneous UV spectrophotometric quantitative analysis of velpatasvir and sofosbuvir. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *267*, 120536.
- Abdelmalak, N. S., & El-Menshawe, S. F. (2012). A new topical fluconazole microsponge loaded hydrogel: preparation and characterization. *Int J Pharm Pharm Sci*, *4*(1), 460–468.
- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., & Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, *99*(5), 1359–1367.
- Abo Mansour, H. E., El-Batsh, M. M., Badawy, N. S., Mehanna, E. T., Mesbah, N. M., & Abo-Elmatty, D. M. (2021). Ginger Extract Loaded into Chitosan Nanoparticles Enhances Cytotoxicity and Reduces Cardiotoxicity of Doxorubicin in Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Nutrition and Cancer*, *73*(11–12), 2347–2362.
- Ahmad Khan, T., Khiang Peh, K., & Seng Ch, H. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharmaceut Sci (Www.Ualberta.ca/~csps)*, *5*(3), 205–212.
- Akaberi, M., Sahebkar, A., Azizi, N., & Emami, S. A. (2019). Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Industrial Crops and Products*, *138*, 111471.

- Akincıbay, H., Şenel, S., & Yetkin Ay, Z. (2007). Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 80(2), 290–296.
- Al-Khashab, Y. E. N., Hummadi, Y. M. K. A.-M., Hamadi, S. A., & Al-Waiz, M. M. (2010). Formulation and evaluation of ciprofloxacin as a topical gel. *Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 80-95.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sağdıç, O., & Budak, Ü. (2010). Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of Helichrysum species collected from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 34(4), 463-473.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., & Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 119(1), 114–122.
- Alemдарođlu, 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.
- Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Shojaosadati, S. A., Dorkoosh, F. A., & Elsabee, M. Z. (2011). Enhancement and Characterization of Chitosan Extraction from the Wastes of Shrimp Packaging Plants. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(3), 776–783.
- Alsarra, I. A. (2009). Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 16–21.
- Araújo, L. B. D. C., Silva, S. L., Galvão, M. A. M., Ferreira, M. R. A., Araújo, E. L., Randau, K. P., & Soares, L. A. L. (2013). Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of Acanthospermum hispidum by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 736–742.
- Baby, A. R., Maciel, C. P. M., Kaneko, T. M., & Velasco, M. V. R. (2006). UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing Trichilia catigua Adr. Juss and Ptychopetalum olacoides

- Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. *Journal of AOAC International*, 89(6), 1532–1537.
- Bachhav, Y. G., & Patravale, V. B. (2010). Formulation of meloxicam gel for topical application: In vitro and in vivo evaluation. *Acta Pharm*, 60, 153–163.
- Badawi, N., El-Say, K., Attia, D., El-Nabarawi, M., Elmazar, M., & Teaima, M. (2020). Development of pomegranate extract-loaded solid lipid nanoparticles: quality by design approach to screen the variables affecting the quality attributes and characterization. *ACS Omega*, 5(34), 21712–21721.
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072–1083.
- Barradas, T. N., Senna, J. P., Cardoso, S. A., e Silva, K. G. de H., & Mansur, C. R. E. (2018). Formulation characterization and in vitro drug release of hydrogel-thickened nanoemulsions for topical delivery of 8-methoxypsoralen. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 245–253.
- Basak, S. C., Reddy, B. M. J., & Mani, K. P. L. (2006). Formulation and release behaviour of sustained release ambroxol hydrochloride HPMC matrix tablet. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(5).
- Bhowmik, D. (2012). Recent advances in novel topical drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 1(9).
- Bimbrawh, S., Chopra, S., Ansari, M. J., Alrobaian, M., Almalki, W. H., Alharbi, K. S., Alenezi, S. K., Kaur, R., Beg, S., & Bhatia, A. (2022). Biocompatible Phospholipid-based nanovesicular drug delivery system of ketoprofen: Systematic development, optimization and preclinical evaluation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.
- Bolzinger, M. A., Briançon, S., Pelletier, J., & Chevalier, Y. (2012). Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(3), 156–165.
- Borman, P., & Elder, D. (2017). Q2 (R1) validation of analytical procedures. *ICH Quality Guidelines*, 127–166.

- Bülbül, A. S., Tarikahya-Hacioğlu, B., Arslan, Y., & Subaşı, I. (2013). Pollen morphology of *Carthamus L.* species in Anatolian flora. *Plant Systematics and Evolution*, 299(3), 683–689.
- Bürgermeister, J., Paper, D. H., Vogl, H., Linhardt, R. J., & Franz, G. (2002). LaPSvS1, a (1→3)- β -galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. *Carbohydrate Research*, 337(16), 1459–1466.
- Campos, L. M., de Oliveira Lemos, A. S., da Cruz, L. F., de Freitas Araújo, M. G., de Mello Botti, G. C. R., Júnior, J. L. R., Rocha, V. N., Denadai, Â. M. L., da Silva, T. P., Tavares, G. D., Scio, E., Fabri, R. L., & Pinto, P. F. (2020). Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110609. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110609>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257.
- Cerda-Opazo, P., Gotteland, M., Oyarzun-Ampuero, F. A., & Garcia, L. (2021). Design, development and evaluation of nanoemulsion containing avocado peel extract with anticancer potential: A novel biological active ingredient to enrich food. *Food Hydrocolloids*, 111, 106370.
- Chen, H.-W., Chang, Y.-W., & Fang, W.-P. (2020). A New Approach for the Microencapsulation of *Clitoria Ternatea* Petal Extracts by a High-Pressure Processing Method. *Pharmaceutics*, 13(1), 23.
- Chung, M. J., Park, J. K., & Park, Y. Il. (2012). Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE–antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *International Immunopharmacology*, 12(2), 453–459.
- Costin, G.-E., & Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal*, 21(4), 976–994.
- Cundell, A. M. (2018). Microbial Ecology of the Human Skin. *Microbial Ecology*, 76(1), 113–120.

- Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ułański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, *17*, 5-20
- D'arcy, P. F., & Howard, E. M. (1967). A new anti-inflammatory test, utilizing the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, *29*(3), 378.
- da Silva Luna, V., Randau, K. P., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2022). Development and validation of analytical method by spectrophotometry UV-Vis for quantification of flavonoids in leaves of *Senna occidentalis* Link. *Research, Society and Development*, *11*(1), e14411118584–e14411118584.
- das Neves, J., & Bahia, M. F. (2006). Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, *318*(1–2), 1–14.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *36*(8), 981–1014.
- de Alvarenga, E. S., Pereira de Oliveira, C., & Roberto Bellato, C. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, *80*(4), 1155–1160.
- Demina, T. S., Gilman, A. B., Akopova, T. A., & Zelenetskii, A. N. (2014). Modification of the chitosan structure and properties using high-energy chemistry methods. *High Energy Chemistry 2014 48:5*, *48*(5), 293–302.
- Dragicevic-Curic, N., Winter, S., Krajisnik, D., Stupar, M., Milic, J., Graefe, S., & Fahr, A. (2010). Stability evaluation of temoporfin-loaded liposomal gels for topical application. *20*(1), 38–48.
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., & Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase Function in Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, *124*(3), 481–492.
- El-Badry, M., & Fetih, G. (2011). Preparation, characterization and anti-inflammatory

- activity of celecoxib chitosan gel formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(2), 201–206.
- Elhefian, E. A. (2010). Rheological study of chitosan and its blends: An overview. *Maejo Int. J. Sci. Technol*, 4(02), 210-220.
- Enggi, C. K., Isa, H. T., Wijaya, S., Ardika, K. A. R., Asri, R. M., Donnelly, R. F., & Permana, A. D. (2022). Validation of spectrophotometric method to quantify cabotegravir in simulated vaginal fluid and porcine vaginal tissue in ex vivo permeation and retention studies from thermosensitive and mucoadhesive gels. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267, 120600.
- EROĞLU, H. E. (2018). Türkiye Helichrysum taksonlarının Türkçe ve diğer dillerdeki isimleri. *Avrasya Terim Dergisi*, 6(1), 26-34.
- Farid, J. F., Mostafa, N. M., Fayez, Y. M., Essam, H. M., & ElTanany, B. M. (2022). Chemometric quality assessment of Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride with Paracetamol impurities; comparative UV-spectrophotometric implementation of four predictive models. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 265, 120308.
- Ferreira, M. O. G., Sá Lima, I., Ribeiro, A. B., Lobo, A. O., Rizzo, M. S., Osajima, J. A., Estevinho, L. M., & Silva-Filho, E. C. (2020). Biocompatible Gels of Chitosan–Buriti Oil for Potential Wound Healing Applications. *Materials*, 13(8), 1977.
- Frankel, E. N., & Finley, J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4901–4908.
- Frenning, G., & Strømme, M. (2003). Drug release modeled by dissolution, diffusion, and immobilization. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1), 137–145.
- Friedman, A. J., Phan, J., Schairer, D. O., Champer, J., Qin, M., Pirouz, A., Blecher-Paz, K., Oren, A., Liu, P. T., & Modlin, R. L. (2013). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), 1231–1239.

- Gallo, J., Raska, M., Kriegova, E., & Goodman, S. B. (2017). Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. *Journal of Orthopaedic Translation*, *10*, 52–67.
- Garg, R., Kaur, S., Ritika, Khatoon, S., Naina, & Verma, H. (2020). A complete and updated review on various types of drug delivery systems. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *12*(4), 1–16.
- Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2014). Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery. *Drug delivery*, *22*(8), 969-987.
- Griffioen, A. W., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, *52*(2), 237–268.
- Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, *1*(20), 5.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., & Li, P. (2005). The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *15*(20), 4600–4603.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*(10), 2023–2044.
- Harding, C. R. (2004). The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic Therapy*, *17*(1), 6–15.
- Hariram Nile, S., & Won Park, S. (2013). Optimized methods for in vitro and in vivo anti-inflammatory assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*(1), 95–100.
- Heuke, S., Vogler, N., Meyer, T., Akimov, D., Kluschke, F., Röwert-Huber, H. J., Lademann, J., Dietzek, B., & Popp, J. (2013). Multimodal mapping of human skin. *British Journal of Dermatology*, *169*(4), 794–803.

- Ibrahim, H. M., & El-Zairy, E. M. R. (2015). Chitosan as a biomaterial—structure, properties, and electrospun nanofibers. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*, 1(1), 81–101.
- Jain, P. S., Chaudhari, A. J., Patel, S. A., Patel, Z. N., & Patel, D. T. (2011). Development and validation of the UV-spectrophotometric method for determination of terbinafine hydrochloride in bulk and in formulation. *Pharmaceutical Methods*, 2(3), 198–202.
- Kang, L., Hui Cheong, H., Yung Chan, S., & Fung Chye Lim, P. (2013). Applications of small-molecule gels—drug delivery. *Soft Fibrillar materials: fabrication and applications*, 115-128.
- Khaing, E. M., Mahadlek, J., Okonogi, S., & Phaechamud, T. (2022). Lime Peel Oil—Incorporated Rosin-Based Antimicrobial In Situ Forming Gel. *Gels*, 8(3), 169.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules 2013, Vol. 18, Pages 2328-2375*, 18(2), 2328–2375.
- Kim, S. (2018). Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities. *International Journal of Polymer Science*, 2018.
- Kogan, G., Skorik, Y. A., Žitňanová, I., Križková, L., Ďuračková, Z., Gomes, C. A. R., Yatluk, Y. G., & Krajčovič, J. (2004). Antioxidant and antimutagenic activity of N-(2-carboxyethyl) chitosan. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 201(3), 303–310.
- Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85–94.
- Kue, C. S., Tan, K. Y., LaM, M. L., & Lee, H. B. (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Experimental Animals*, 14–59.
- Kumar, A., Vimal, A., & Kumar, A. (2016). Why Chitosan? From properties to

- perspective of mucosal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 615–622.
- Kwiatkowska, M., Franklin, S. E., Hendriks, C. P., & Kwiatkowski, K. (2009). Friction and deformation behaviour of human skin. *Wear*, 267(5–8), 1264–1273.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), 359–370.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M. D., & Gupta, A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149–1158.
- Lee, B. C., Pangeni, R., Na, J., Koo, K.-T., & Park, J. W. (2019). Preparation and in vivo evaluation of a highly skin-and nail-permeable efinaconazole topical formulation for enhanced treatment of onychomycosis. *Drug Delivery*, 26(1), 1167–1177.
- Lee, Y.-R., Woo, K.-S., Kim, K.-J., Son, J.-R., & Jeong, H.-S. (2007). Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough rice. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 765–770.
- Lemaire, V., Belair, J., & Hildgen, P. (2003). Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *International Journal of Pharmaceutics*, 258(1–2), 95–107.
- Li, Y., Chen, L., Liu, Y., Zhang, Y., Liang, Y., & Mei, Y. (2018). Anti-inflammatory effects in a mouse osteoarthritis model of a mixture of glucosamine and chitooligosaccharides produced by bi-enzyme single-step hydrolysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9.
- Li, Y., Liu, H., Xu, Q.-S., Du, Y.-G., & Xu, J. (2014). Chitosan oligosaccharides block LPS-induced O-GlcNAcylation of NF-κB and endothelial inflammatory response. *Carbohydrate Polymers*, 99, 568–578.
- Lipsky, B. A., & Hoey, C. (2009). Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clinical Infectious Diseases*, 49(10), 1541–1549.

- Lizardi-Mendoza, J., Argüelles Monal, W. M., & Goycoolea Valencia, F. M. (2016). Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, 3–31.
- Lu, G. W., & Gao, P. (2010). Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, 59–94.
- Lukic, M., Filipovic, M., Pajic, N., Lunter, D., Bozic, D., & Savic, S. (2021). Formulation of topical acidic products and acidification of the skin—Contribution of glycolic acid. *International Journal of Cosmetic Science*, 43(4), 419–431.
- Lukić, M., Pantelić, I., & Savić, S. D. (2021). Towards optimal pH of the skin and topical formulations: From the current state of the art to tailored products. *Cosmetics*, 8(3), 69.
- Ma, P., Liu, H.-T., Wei, P., Xu, Q.-S., Bai, X.-F., Du, Y.-G., & Yu, C. (2011). Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1391–1398.
- Manne, A. A., Arigela, B., Giduturi, A. K., Komaravolu, R. K., Mangamuri, U., & Poda, S. (2021). Pterocarpus marsupium Roxburgh heartwood extract/chitosan nanoparticles loaded hydrogel as an innovative wound healing agent in the diabetic rat model. *Materials Today Communications*, 26, 101916.
- Marrakchi, S., & Maibach, H. I. (2007). Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact Dermatitis*, 57(1), 28–34.
- Migues, V. H., David, J. M., Gomes, A. F., & David, J. P. (2022). Determination of Soybean Isoflavone by HPLC/DAD and Simple UV Spectroscopic Analysis: a Comparative Study. *Food Analytical Methods*, 15(2), 367–376.
- Mikesh, L. M., Aramadhaka, L. R., Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C., & Fox, J. W. (2013). Proteomic anatomy of human skin. *Journal of Proteomics*, 84, 190–200.
- Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant

- activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31–42.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*, 26(2), 211–219.
- Moran, H. B. T., Turley, J. L., Andersson, M., & Lavelle, E. C. (2018). Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, 184, 1–9.
- Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52(2), 103–112.
- Mouro, C., Dunne, C. P., & Gouveia, I. C. (2020). Designing new antibacterial wound dressings: development of a dual layer cotton material coated with poly (vinyl alcohol) _chitosan nanofibers incorporating Agrimonia eupatoria L. extract. *Molecules*, 26(1), 83.
- Moussaoui, Y., Mnasri, N., Elaloui, E., Ben Salem, R., Lagerge, S., & De Menorval, L. C. (2012). Preparation of chitosan gel. *EPJ Web of Conferences*, 29, 00034.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358–1368.
- Narasimhan, B. (2001). Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2–3), 195–210.
- Nejat, H., Rabiee, M., Varshochian, R., Tahriri, M., Jazayeri, H. E., Rajadas, J., Ye, H., Cui, Z., & Tayebi, L. (2017). Preparation and characterization of cardamom extract-loaded gelatin nanoparticles as effective targeted drug delivery system to treat glioblastoma. *Reactive and Functional Polymers*, 120, 46–56.
- Ng, K. W., & Lau, W. M. (2015). Skin deep: The basics of human skin structure and drug penetration. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, 3–11.
- Ni'mah, Y. L., Harmami, H., Ulfan, I., Suprpto, S., & Saleh, C. W. (2019). Water-soluble

- chitosan preparation from marine sources. / *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(2), 159–163.
- Nilsen-Nygaard, J., Strand, S. P., Vårum, K. M., Draget, K. I., & Nordgård, C. T. (2015). Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* 2015, Vol. 7, Pages 552-579, 7(3), 552–579.
- Nithya, S., Nimal, T. R., Baranwal, G., Suresh, M. K., Anju, C. P., Kumar, V. A., Mohan, C. G., Jayakumar, R., & Biswas, R. (2018). Preparation, characterization and efficacy of lysostaphin-chitosan gel against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 157–166.
- Ogawa, K., Yui, T., & Okuyama, K. (2004). Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1–2), 1–8.
- Oliveira, M. I., Santos, S. G., Oliveira, M. J., Torres, A. L., & Barbosa, M. A. (2012). Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. *Eur Cell Mater*, 24(136), 133–136.
- Orhan, I., & Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 386–390.
- Özgürtaş, T. (2009). Anjiyogenezde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi*, 51(1), 67–69.
- Öztürk, A. A. (2017). *Deksketoprofen Trometamol Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in Vitro/In Vivo Değerlendirilmesi*. Anadolu University (Turkey).
- Öztürk, A. A., & Kıyan, H. T. (2020). Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay. *Microvascular Research*, 128, 103961.
- Paarakh, M. P., Jose, P. A., Setty, C. M., & Christoper, G. V. P. (2018). Release kinetics—concepts and applications. *Int. J. Pharm. Res. Technol*, 8(1), 12–20.
- Paper, D. H., Karall, E., Kremser, M., & Krenn, L. (2005). Comparison of the

- antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(4), 323–326.
- Parpani, S., Narke, R., & Chavan, R. (2014). Emulgel: A recent approach for topical drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 112–123
- Peniche Covas, C. A., Argüelles-Monal, W., & Goycoolea, F. M. (2008). Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 517–542.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.
- Prabaharan, M. (2008). Review paper: Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 23(1), 5–36.
- Proksch, E. (2018). pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*, 45(9), 1044–1052.
- Ramanathan, S., & Block, L. H. (2001). The use of chitosan gels as matrices for electrically-modulated drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 70(1–2), 109–123.
- Rapalli, V. K., Kaul, V., Gorantla, S., Waghule, T., Dubey, S. K., Pandey, M. M., & Singhvi, G. (2020). UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: method development, in-vitro and ex-vivo applications in topical delivery. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 224, 117392.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Ribatti, D. (2005). The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *British Journal of Haematology*,

128(3), 303–309.

Ribatti, D. (2008). *History of research on tumor angiogenesis*. Springer Science & Business Media.

Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of Development*, 141, 70–77.

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 264(4), 317–324.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632.

Roberts, M. S., Cheruvu, H. S., Mangion, S. E., Alinaghi, A., Benson, H. A. E., Mohammed, Y., Holmes, A., van der Hoek, J., Pastore, M., & Grice, J. E. (2021). Topical drug delivery: History, percutaneous absorption, and product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 177, 113929.

Rolim, A., Oishi, T., Maciel, C. P. M., Zague, V., Pinto, C. A. S. O., Kaneko, T. M., Consiglieri, V. O., & Velasco, M. V. R. (2006). Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. *International Journal of Pharmaceutics*, 308(1–2), 107–114.

Sacco, P., Furlani, F., Marzo, G. De, Marsich, E., Paoletti, S., & Donati, I. (2018). Concepts for Developing Physical Gels of Chitosan and of Chitosan Derivatives. *Gels 2018, Vol. 4, Page 67*, 4(3), 67.

Salunkhe, S. S., & Bhatia, N. (2013). Benchmark in the era of drug carriers for semisolid based topical delivery system. *Am. J. PharmTech Res.*, 3, 493-510

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270–276.

Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., & Korting, H. C. (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery*

Reviews, 59(6), 427–443

- Schrage, A., Gamer, A. O., van Ravenzwaay, B., & Landsiedel, R. (2010). Experience with the HET-CAM method in the routine testing of a broad variety of chemicals and formulations. *Alternatives to Laboratory Animals*, 38(1), 39–52.
- Segger, D., Aßmus, U., Brock, M., Erasmy, J., Finkel, P., Fitzner, A., Heuss, H., Kortemeier, U., Munke, S., & Rheinländer, T. (2008). Multicenter study on measurement of the natural pH of the skin surface. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(1), 75.
- Şenel, S., & McClure, S. J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(10), 1467–1480.
- Seow, L.-J., Beh, H.-K., Sadikun, A., & Asmawi, M. Z. (2014). Evaluation of anti-inflammatory effect of traditional medicinal plants, *Gynura segetum*. *CELLMED*, 4(1), 1–4.
- Shepherd, R., Reader, S., & Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 14, 535–542.
- Shon, M.-Y., Kim, T.-H., & Sung, N.-J. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82(4), 593–597.
- Silva, N. H. C. S., Drumond, I., Almeida, I. F., Costa, P., Rosado, C. F., Neto, C. P., Freire, C. S. R., & Silvestre, A. J. D. (2014). Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: a potential innovative system for cellulite treatment. *Cellulose*, 21(1), 665–674.
- Gupta, A., Mishra, A. K., Singh, A. K., Gupta, V., & Bansal, P. (2010). Formulation and evaluation of topical gel of diclofenac sodium using different polymers. *Drug invention today*, 2(5), 250–253
- Singh, R., Shitiz, K., & Singh, A. (2017). Chitin and chitosan: biopolymers for wound management. *International Wound Journal*, 14(6), 1276–1289.
- Sobral-Souza, D. F., Gouveia, T. H. N., Condeles, A. L., Junior, J. C. T., Muniz, B. V., Franz-Montan, M., Pauli, M. C., Leonardi, G. R., & Lima, D. A. N. L. (2022). Effect

- of accelerated stability on the physical, chemical, and mechanical properties of experimental bleaching gels containing different bioadhesive polymers. *Clinical Oral Investigations*, 1–11.
- Steiling, W., Bracher, M., Courtellemont, P., & De Silva, O. (1999). The HET–CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in Vitro*, 13(2), 375–384.
- Suman, D., Sangeeta, Beena, K., Suman, D., Sangeeta, & Beena, K. (2020). Emugel for topical drug delivery: A novel approach. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 104-114.
- Sun, T., Xie, W., & Xu, P. (2004). Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 379–382.
- Sweeney, C., Dudhipala, N., Thakkar, R., Mehraj, T., Marathe, S., Gul, W., ElSohly, M. A., Murphy, B., & Majumdar, S. (2022). Impact of mucoadhesive agent inclusion on the intraocular pressure lowering profile of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-valine-hemisuccinate loaded nanoemulsions in New Zealand white rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, 616, 121564.
- Tadwee, I. K., Gore, S., & Giradkar, P. (2011). Advances in Topical Drug Delivery System: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 1, 14–23.
- Tanker, N., & Sezik, G. (1978). G. Researches on Species of Helichrysum Growing in Turkey, from the Point of view of Pharmaceutical Botany. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 8(1), 19-39.
- Tavares, L., Noreña, C. P. Z., Barros, H. L., Smaoui, S., Lima, P. S., & de Oliveira, M. M. (2022). Rheological and structural trends on encapsulation of bioactive compounds of essential oils: A global systematic review of recent research. *Food Hydrocolloids*, 107628.
- Varshosaz, J., Jaffari, F., & Karimzadeh, S. (2006). Development of bioadhesive chitosan gels for topical delivery of lidocaine. *Scientia Pharmaceutica*, 74(4), 209–223.
- Varshosaz, J., Taymouri, S., Minaiyan, M., Rastegarnasab, F., & Baradaran, A. (2018).

- Development and in vitro/in vivo evaluation of HPMC/chitosan gel containing simvastatin loaded self-assembled nanomicelles as a potent wound healing agent. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(2), 276-288.
- Walsh, D. A., & Pearson, C. I. (2001). Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 3(3), 1–7.
- Wang, C., Gao, X., Chen, Z., Chen, Y., & Chen, H. (2017). Preparation, characterization and application of polysaccharide-based metallic nanoparticles: a review. *Polymers*, 9(12), 689.
- Watkinson, A. C., Bunge, A. L., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2013). Nanoparticles do not penetrate human skin - A theoretical perspective. *Pharmaceutical Research*, 30(8), 1943–1946.
- Weiss, S. C. (2011). Conventional topical delivery systems. *Dermatologic Therapy*, 24(5), 471–476.
- Wilson, T. D., & Steck, W. F. (2000). A modified HET–CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 38(10), 867–872.
- Xie, W., Xu, P., & Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(13), 1699–1701.
- Yang, E.-J., Kim, J.-G., Kim, J.-Y., Kim, S. C., Lee, N. H., & Hyun, C.-G. (2010). Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. *Central European Journal of Biology*, 5(1), 95–102.
- Yang, H., Li, J., Patel, S. K., Palmer, K. E., Devlin, B., & Rohan, L. C. (2019). Design of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles for vaginal co-delivery of griffithsin and dapivirine and their synergistic effect for HIV prophylaxis. *Pharmaceutics*, 11(4), 184.
- Yazan, Y. (2002). Reoloji ve kozmetolojideki yeri. *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*, 3, 115–127.
- Yonese, M. (2001). Sustained drug delivery by Gels. *Gels Handbook*, 230–240.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: an

add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263–271.

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