T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZENCEFİL (*ZINGIBER OFFICINALE*) UÇUCU YAĞI İÇEREN TOPİKAL FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI VE *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

BEYZA ÇELEN

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ İMREN ESENTÜRK GÜZEL

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
NİSAN/2026

İTHAF

“Hayatımın her anında yanımda olan anneme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve tamamlanması sürecinde bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her aşamada desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Evren ALĞIN YAPAR ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi İmren ESENTÜRK GÜZEL tez danışman hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan Sayın Dekanımız Prof. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR'a teşekkür ederim.

Çalışmam süresince katkı sağlayan, bana destek olan Arş. Gör. Dr. Aslı GÜRBÜZ YURTSEVER ve Arş. Gör. CEREN KOCA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, sabır ve anlayışlarıyla bana güç veren sevgili aileme ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan fakülte arkadaşlarım Lüceyn ABDO ve Sona BODAGHİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu çalışmayı büyük bir özveri ve sabırla, gece gündüz demeden tamamlayabilmiş olmam dolayısıyla en büyük teşekkürü kendime sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
TABLOLAR LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. DERİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ 3
2.2. DERİ HASTALIKLARI 4
2.3. ZENCEFİL (*ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE*) BİTKİSİ 5
2.3.1. Botanik Özellikleri 5
2.3.2. Kimyasal İçerik 6
2.3.3. Farmakolojik Özellikler 6
2.4. ZENCEFİL UÇUCU YAĞI 7
2.4.1. Elde Edilme Yöntemleri 7
2.4.2. Uçucu Yağın Bileşenleri 7
2.4.3. Antimikrobiyal ve Antiviral Etkiler 8
2.4.4. Zencefil Uçucu Yağının Topikal Kullanımı 8
2.5. TOPİKAL İLAÇ UYGULAMA YOLU 9
2.5.1. Krem, Merhem ve Jellerin Genel Özellikleri 10
2.5.2. Formülasyon Seçiminde Dikkat Edilecek Faktörler 11
2.6. TOPİKAL YOLLA UYGULANAN YENİLİKÇİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİ 12
2.7. NANOEMÜLSİYONLAR 12
2.7.1. Nanoemülsiyonların Avantajları 13
2.7.2. Dezavantajları ve Sınırlılıkları 14
2.7.3. Nanoemülsiyon Hazırlama Yöntemleri 15
2.7.4. Nanoemülsiyon Karakterizasyonu 16
2.7.4.1. Damlacık boyutu ve dağılım 16
2.7.4.2. Zeta potansiyeli 16
2.7.4.3. pH 17

2.7.4.4. Viskozite……17
2.8. NANOEMÜLJEL 17
2.8.1. Nanoemüljellerin Avantajları 17
2.8.2. Nanoemüljellerin Dezavantajları 19
2.8.3. Nanoemüljel Karakterizasyonu..... 19
2.8.4. Nanoemüljel Hazırlanma Yöntemleri 19
2.9. KOZMETİK VE FARMASÖTİK UYGULAMA ALANLARI..... 20
2.9.1. İlaç 20
2.9.2. Kozmetik..... 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM..... 21
3.1.GEREÇ 21
3.1.1. Kullanılan Aletler 21
3.1.2. Kullanılan Malzemeler 22
3.2. UÇUCU YAĞ ANALİZİ..... 22
3.3. NANOEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI 23
3.4. NANOEMÜLSİYON HAZIRLANMASI 24
3.5. NANOEMÜLSİYONUN KARAKTERİZASYONU 25
3.5.1. Makroskobik Analiz 25
3.5.2. Damlacık Boyutu, PDI ve Özelliklerinin Belirlenmesi ..... ……25
3.5.3. Zeta Potansiyeli..... 26
3.5.4. İletkenlik 26
3.5.5. pH Ölçümleri 26
3.6. NANOEMÜLSİYONLARIN STABİLİTE ÇALIŞMASI 27
3.6.1. Makroskobik Analiz, Damlacık Boyutu, PDI, pH, Zeta Potansiyeli ve İletkenlik Ölçümleri 25
3.6.2. Santrifüj Test..... 25
3.6.3. Termal Test 25
3.7. MORFOLOJİK ANALİZ 28
3.8. NANOEMÜLJEL HAZIRLANMASI..... 28
3.9. NANOEMÜLJEL FORMÜLASYONUNUN KARAKTERİZASYONU 29
3.9.1. pH Ölçümü..... 29
3.9.2. İletkenlik Ölçümü 29
3.9.3. Viskozite Ölçümü 30
3.9.4. Tekstür Profil Analizi 30
3.9.5. Yayılabilirlik Ölçümü 31
3.9.6. *Ex vivo* Biyoadezyon 32

3.10. *IN VITRO* ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI 33
3.10.1. Agar Difüzyon Çalışması 33
3.10.2. Mikrodilüsyon Çalışması 33
3.10.3. Zamana Bağlı Öldürme Çalışması 34
3.11. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI 34
3.11.1. *In Vitro* Sitotoksisite 34
3.11.2. Çizik Testi 35
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 35
4. BULGULAR 36
4.1. UÇUCU YAĞ ANALİZİ 36
4.2. NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI 38
4.3. NANOEMÜLSİYONLARIN KARAKTERİZASYONU 39
4.3.1. Makroskobik İncelemeye Ait Bulgular 39
4.3.2. Damlacık Boyutu ve PDI 39
4.3.3. pH 39
4.3.4. Zeta Potansiyeli 40
4.3.5. İletkenlik 40
4.4. NANOEMÜLSİYONLARIN STABİLİTE ÇALIŞMASI 40
4.4.1. Makroskobik İncelemeye Ait Bulgular 41
4.4.2. Damlacık Boyutu ve PDI 42
4.4.3. Zeta Potansiyeli 42
4.4.4. İletkenlik Özellikleri 43
4.4.5. pH 43
4.4.6. Santrifüj Testi 43
4.4.7. Termal Stabilite Testi 44
4.5. MORFOLOJİK ANALİZ 44
4.6. NANOEMÜLJELLERİN KARAKTERİZASYONU 45
4.6.1. pH 46
4.6.2. İletkenlik 46
4.6.3. Reolojik Analiz 46
4.6.4. Tekstür Profil Analizi 47
4.6.5. Yayılabilirlik 49
4.6.6. *Ex vivo* Biyoadezyon 49
4.7. *IN VITRO* ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI 50
4.7.1. Agar Difüzyon Testi 50
4.7.2. Mikrodilüsyon Çalışması 51

4.7.3. Zamana Bağlı Öldürme Çalışması 53
4.8. *IN VITRO* HÜCRE ÇALIŞMALARI 53
4.8.1. *In Vitro* Sitotoksisite Testi 53
4.8.2. Çizik Testi 56
5.TARTIŞMA 58
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 67
7. KAYNAKÇA 68
ÖZ GEÇMİŞ……...……...…….76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 : Kullanılan aletler ve marka, modelleri 21

Tablo 3.2 : Kullanılan malzemeler ve firma isimleri 22

Tablo 3.3 : Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonları 24

Tablo 3.4 : 5 g ön formülasyon hazırlanması için gereken madde miktarları (g) 24

Tablo 3.5 : Nanoemüljel formülasyonlarda kullanılan polimerler ve kullanım miktarları (%) 29

Tablo 4.1 : Zencefil uçucu yağ bileşenleri 36

Tablo 4.2 : Nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutları ve PDI değerleri 38

Tablo 4.3 : Nanoemülsiyonların stabilite çalışması. 40

Tablo 4.4 : Stabilite testleri için hazırlanan formülasyonların makroskobik incelemesi 42

Tablo 4.5 : Nanoemüljellerin hız ve kayma hızı arttıkça oluşan viskozite değerleri 46

Tablo 4.6 : Nanoemüljellerin tekstür profil analiz sonuçları 48

Tablo 4.7 : Nanoemüljellerin *ex vivo* biyoadezyon sonuçları 50

Tablo 4.8 : Agar difüzyon testi inhibisyon bölgesi çapları (mm) 51

Tablo 4.9 : Nanoemülsiyonların ve zencefil uçucu yağının (seyreltme oranları) MIC ve MBC değerleri 52

Tablo 4.10 : NE5, NEG2 ve NEG4 formülasyonlarının hücre canlılığı sonuçlarının ortalama ± standart sapma (SS) değerleri (%) 54

Tablo 4.11 : NE11, NEG1 ve NEG3 formülasyonlarının hücre canlılığı sonuçlarının ortalama ± standart sapma (SS) değerleri (%) 55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 : Derinin yapısı 3

Şekil 2.2 : Yüzde görülen akne vulgaris 5

Şekil 2.3 : Zencefil bitkisine ait rizomlar 6

Şekil 2.4 : Nanoemülsiyon hazırlanması 12

Şekil 3.1 : Tekstür Profil Analizi (TPA) 30

Şekil 3.2 : Yayılabilirlik ölçümü 31

Şekil 3.3 : *Ex vivo* biyoadezyon çalışması 32

Şekil 4.1 : Nanoemüljel hazırlanması için seçilen nanoemülsiyonların görünümü 39

Şekil 4.2 : Nanoemülsiyonların 0.gün, 15.gün, 30.günlerdeki görünümleri 41

Şekil 4.3 : Santrifüj testi öncesi ve sonrası nanoemülsiyonların görünüşü 44

Şekil 4.4 : STEM görüntüleri 45

Şekil 4.5 : Geliştirilen nanoemüljeller formülasyonlarının görünüşleri 45

Şekil 4.6 : Nanoemüljel formülasyonlarının kayma hızına bağlı değişim grafikleri 47

Şekil 4.7 : Tekstür profil analizi sonuçları 48

Şekil 4.8 : Agar difüzyon testi çalışması 50

Şekil 4.9 : Zamana bağlı öldürme eğrisi sonuçları 53

Şekil 4.10 : NE5, NEG2 ve NEG4 formülasyonlarının karşılaştırmalı *in vitro* sitotoksisite testi sonuçları 54

Şekil 4.11 : NE11, NEG1 ve NEG3 formülasyonlarının karşılaştırmalı *in vitro* sitotoksisite testi sonuçları 55

Şekil 4.12 : *In vitro* çizik testi sonuçlarına göre % yara kapanma oranları 56

Şekil 4.13 : Çizik testinde oluşturulan hücre boşluğunun 0, 24 ve 30. saatlerdeki görüntüleri 57

SİMGELER VE KISALTMALAR

DLS : Dinamik Işık Saçılımı

PDI : Polidispersite İndeksi

TEA **:** Trietanolamin

STEM : Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu

Zencefil (*Zingiber officinale*) Uçucu Yağı İçeren Topikal Formülasyonların Hazırlanması ve *In Vitro* Değerlendirilmesi

ÖZET

Amaç: Zencefil (*Zingiber officinale Roscoe*) uçucu yağı, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri ile öne çıkan doğal bir bileşen olup, topikal uygulamalarda etkililiğinin artırılması için uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında, zencefil uçucu yağı içeren nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının geliştirilmesi ve akne vulgaris'e karşı *in vitro* etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Nanoemülsiyonlar ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanmış; damlacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerine göre uygun formülasyonlar seçilerek stabilite çalışmaları yürütülmüştür. Nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutu, PDI, pH, zeta potansiyeli ve iletkenlik özellikleri analiz edilmiştir. Morfolojik değerlendirmeler STEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Nanoemüljel formülasyonları Carbopol (%0,5) ve hyalüronik asit (%1,5) kullanılarak hazırlanmış; reolojik ve tekstür özellikleri ve ayrıca *ex vivo* domuz derisine biyoadezyon özellikleri incelenmiştir. *In vitro* antimikrobiyal etkinlik agar difüzyon, mikrodilüsyon ve zamana bağlı öldürme testleri ile değerlendirilmiş; *in vitro* biyouyumluluk ve çizik testi çalışmaları yapılmıştır.

Bulgular: Optimum nanoemülsiyonların %4 uçucu yağ içerdiği, damlacık boyutlarının 142–172 nm ve PDI değerlerinin 0,17–0,21 olduğu belirlenmiştir. Nanoemüljellerin *ex vivo* domuz derisinde biyoadezyonu artırdığı, akne suşlarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, sitotoksik etki göstermediği ve *in vitro* yara iyileşmesini desteklediği görülmüştür.

Sonuç: Elde edilen bulgular doğrultusunda, geliştirilen nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının akne vulgaris tedavisinde ve yara iyileşmesinin desteklenmesinde umut vadeden topikal sistemler olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, bu sistemlerin klinik etkinliğinin ve uzun dönem güvenilirliğinin ortaya konulabilmesi için ileri düzey *in vivo* ve klinik çalışmaların yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Nanoemülsiyon, Nanoemüljel, *Zingiber officinale Roscoe*, Zencefil Uçucu Yağı, Topikal Akne Tedavisi

Preparation and *In vitro* Evaluation of Topical Formulations Containing Ginger (*Zingiber officinale*) Essential Oil

ABSTRACT

Aim: Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) essential oil is a natural component that stands out for its antimicrobial and anti-inflammatory effects, and the development of suitable carrier systems to increase its efficacy in topical applications is of great importance. This thesis aims to develop nanoemulsion and nanoemulgel formulations containing ginger essential oil and to evaluate the *in vitro* efficacy of these systems against acne vulgaris.

Materials and Methods: Nanoemulsions were prepared by ultrasonication; suitable formulations were selected according to droplet size and polydispersity index (PDI) values, and stability studies were carried out. Droplet size, PDI, pH, zeta potential, and conductivity properties of nanoemulsion formulations were analyzed. Morphological evaluations were performed using STEM analysis. Nanoemulgel formulations were prepared using Carbopol (0.5%) and hyaluronic acid (1.5%); their rheological properties, textural properties, and *ex vivo* bioadhesion properties to pig skin were investigated. *In vitro* antimicrobial activity was evaluated using agar diffusion, microdilution, and time-kill curve tests; *in vitro* biocompatibility and scratch test (wound healing) studies were also conducted.

Results: It was determined that optimum nanoemulsion formulations contained 4% essential oil, had droplet sizes of 142-172 nm, and PDI values in the range of 0.17-0.21. Nanoemulsion and nanoemulgel formulations were found to increase bioadhesion in *ex vivo* porcine skin and exhibit significant antimicrobial activity against acne strains. Furthermore, the formulations showed no cytotoxic effects *in vitro* and promoted *in vitro* wound healing.

Conclusion: Based on the results, it was concluded that the developed nanoemulsion and nanoemulgel formulations are promising topical systems for the treatment of acne vulgaris and for supporting wound healing. However, further *in vivo* and clinical studies are necessary to establish the clinical efficacy and long-term safety of these systems.

Keywords: Nanoemulsion, Nanoemulgel, *Zingiber officinale Roscoe*, Ginger Essential Oil, Topical Acne Treatment

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri hastalıkları, dünya çapındaki insanların %30-%70'ini etkileyen önemli hastalıklardan biridir (1). Deri hastalıkları; kişilerin yaşam kalitesini düşürüp, psikolojisini ve sosyal yaşamanı etkileyen önemli bir sorundur (2). Akne vulgaris, atopik dermatit, selülit, apseler ve verruca vulgaris deri hastalıklarına örnek olarak verilebilir (3). Bu tedavilerde kullanılan sentetik bileşenler yan etkilere ve direnç oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı yan etkinin daha düşük olduğu, güvenli ve etkili olan doğal alternatiflere olan ilgi artmıştır (4). Bu bağlamda, bitkisel kökenli biyoaktif bileşikler, özellikle de uçucu yağlar, deri hastalıklarının tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olarak dikkat çekmektedir.

Zencefil uçucu yağı, gingeroller ve shoagoller de dahil olmak üzere içerdiği birçok aktif bileşen sayesinde antienflamatuar, antibakteriyel, antipiretik, gastroprotektif ve analjezik etkilere sahiptir (5). Uçucu yağların stabilite sorunları, yüksek uçucu olması ve düşük sulu ortam çözünürlüğü nedeniyle topikal uygulamalardaki kullanımını sınırlamaktadır (6). Yapılan son çalışmalarda bu dezavantajların giderilmesi için nanoteknolojik taşıyıcı sistemlerin topikal uygulamalarda kullanılması dikkat çekmektedir. İlaç çözünürlüğünün artması, daha uzun süre stabiliteyi, daha yüksek biyoyararlanımı ve hasta uyuncunun artmasını sağlamak için nano taşıyıcılardan yararlanılmaktadır. Nanoemülsiyonlar, nanoemüljeller, lipozomlar, niosomlar ve nano yapılı lipid taşıyıcılar nanotaşıyıcılara örnek olarak verilebilir (7). Nanoemülsiyonların yüzey alanlarının geniş olması ilacın çözünmesi ve emilimi arttırır. İlaç dağıtımındaki biyoyararlanım, stabilite, çözünürlük gibi büyük sorunların çözümü için etkilidirler. Ayrıca nanoemülsiyonların biyolojik membranlardan geçiş kolaylığı sağlaması suda az çözünür olan ilaçlar ve uçucu yağların kullanımı için fırsat oluşturmaktadır (8).

Nanoemülsiyon sistemlerinin viskozitesinin düşük olması dezavantajı jelleştirilip naneomüljele dönüştürülerek giderilebilir. Bu sayede uygun viskozite, artmış temas süresi ve uygulama kolaylığı sağlanabilmektedir (9). Nanoemüljel sistemleri, hem nano boyutlu taşıyıcı sistemlerin sağladığı etkin madde taşınımını hem de jel formunun deri yüzeyinde kalıcılığını birlikte göstererek özellikle deri hastalıklarının tedavisinde umut vadeden formülasyonlar olarak değerlendirilmektedir.

Literatürde zencefil içeren nanoemülsiyon sistemlerine ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte, bu sistemlerin nanoemüljel formuna dönüştürülerek özellikle deri problemlerine

yönelik kullanım potansiyelinin kapsamlı olarak incelendiği çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Özellikle antimikrobiyal etkinlik, biyouyumluluk ve biyolojik olarak değerlendirilmesi gibi parametrelerin birlikte incelenmesi, bu tür formülasyonların topikal uygulamalardaki etkinliğinin ortaya konulması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, zencefil uçucu yağı içeren nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının geliştirilmesi ve bu sistemlerin *in vitro* koşullarda incelenmesi, deri hastalıklarına alternatif ve etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilecek niteliktedir.

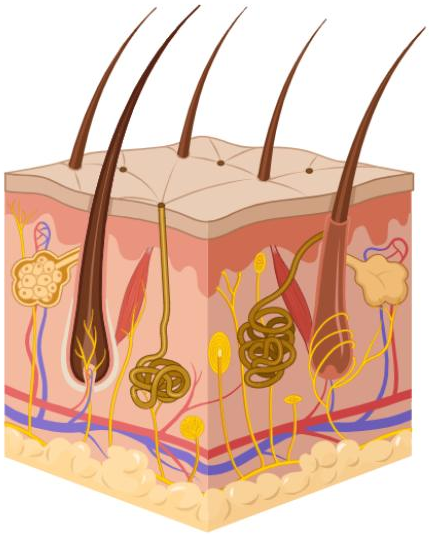
Bu çalışmanın temel amacı, zencefil uçucu yağı içeren nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının geliştirilmesi ve bu formülasyonların *in vitro* koşullarda kapsamlı olarak değerlendirilmesidir. Bu doğrultuda, hazırlanan sistemlerin damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyeli, pH ve iletkenlik gibi fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve stabilite özelliklerinin incelenmesi planlanmıştır. Ayrıca, formülasyonların antimikrobiyal etkinlikleri, sitotoksisiteleri ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin *in vitro* yöntemlerle değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, zencefil uçucu yağının nano taşıyıcı sistemler aracılığıyla uygulanmasının etkinlik ve stabilite açısından sağladığı katkıların ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DERİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Deri, insan vücut ağırlığının yaklaşık olarak %15'ini oluşturur. İnsan vücudunun en büyük organı olup birçok hayati fonksiyonu bulunur (10). Fiziksel hasarlardan korumak, vücut sıcaklığını düzenlemek, bakteri istilalarından korumak, kimyasal tehlikelere karşı korumak ve vücudun su dengesini sağlamak derinin fonksiyonlarından bazılarıdır (11).

Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç ana katmandan oluşur. En üstte bulunan epidermis tabakası, çok katmanlı yassı keratinize epitel dokudan oluşur. Yapısında keratinositler, melanositler, Merkel hücreleri ve Langerhans hücreleri olmak üzere 4 farklı hücre bulunmaktadır. Epidermis tabakasında en fazla bulunan hücre tipi keratinositlerdir. Melanin üreten melanositler, dokunma duyusunun algılanmasını sağlayan Merkel hücreleri ve antijenleri yakalayıp tanıyan Langerhans hücreleri epidermis tabakasında bulunan diğer hücre çeşitleridir (12).



Şekil 2.1 : Derinin yapısı

Dermis tabakası, epidermis tabakası ile bazal bir membran sayesinde ayrılan ve epidermis tabakasının altında yer alan tabakadır. Dermis, yoğun, düzensiz, kollajenöz bağ dokusundan oluşur. Dermis tabakasında kılcal damarlar, sinirler, duyu organları, kıl folikülleri,

ter ve yağ bezleri ile kıl erektör kasları yer alır. Yüzeysel papiller ve retiküler katman olmak üzere dermiş tabakası iki tabakadan oluşur. Rastgele dağılmış bağ dokusu hücreleri, tip III kollajen, gevşek elastik liflerden oluşan ağ yapısı ve vücut sıcaklığı düzenleyen ve epidermisi besleyen kılcal damarlar bulunmaktadır. Retiküler katman ise hücreler, kan ve lenf damarları içeren yoğun düzensiz, kollajenöz bağ dokusundan oluşmaktadır. Ter bezleri ve deri sinirleri de bu katmanda yer almaktadır. Ter bezleri, yağ bezleri, saç ve tırnaklar da derinin türevleridir (13).

Derinin duyusal algılama, termoregülasyon, koruma ve metabolizma olmak üzere dört temel fonksiyonu vardır. Ağrı, sıcaklık, basınç ve dokunmayı algılayan farklı reseptör hücreleri duyusal algıyı sağlar. Vücudun iç ve dış kısımları arasında bariyer oluşturarak UV ışığı, patojenler, fiziksel ve kimyasal stres ve enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. Deri altındaki yağ dokusu sayesinde ise lipid depolanmasını ve D vitamini üretimini sağlar (14).

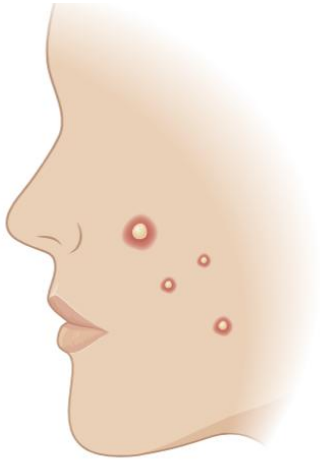
2.2. DERİ HASTALIKLARI

Deri hastalıkları genellikle Dünya Sağlık Örgütü'nün ICD-11 sistemine göre sınıflandırılmaktadır. ICD-11 morfolojik ve etyolojik özelliklere göre deri hastalıklarını sınıflandırır. Bununla birlikte tedavi ve tanı kodlaması için bir standart oluşturur (15).

Deri hastalıkları, dünya çapında insanların %30-%70'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Üç katmanlı bir yapıya sahip olan deride bazen çeşitli enfeksiyonlar oluşabilmektedir. Bu enfeksiyonlara bakteri, virüs veya mantar neden olabilir (16). Deri enfeksiyonları en yaygın enfeksiyon türlerinden biridir. Bu enfeksiyonlar insanların sağlığına zarar verir, psikolojilerini ve sosyal yaşamlarını etkiler. Bazı durumlarda bulaşıcı olabilir (17). Yaygın örnekler arasında akne vulgaris, atopik dermatit, selülit, apseler ve verruca vulgaris yer alır (3).

Akne vulgaris sıklıkla görülen, çoğunlukla ergenlerde ve genç erişkinlerde görülen, çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan kronik iltihaplı deri hastalığından biridir (18). Sebase foliküllerinin tıkanması, hiperkeratinizasyon, fazla sebum üretimi, *Cutibacterium acnes, Staphylococcus epidermis* bakterilerinin gözeneklerde çoğalması gibi sebepler akne oluşumuna sebep olur (19,20). Enflamatuar olmayan, komedon şeklinde ve iltihaplı olarak papül, püstül, kist şekillerinde farklı lezyon türleri mevcuttur (21). Akne vulgaris vücutta, yüzde, sırtta omuzlarda ve kollarda bulunabilir (22). Akne, vücutta kalıcı yara izleri oluşmasına sebep olabilmekte, kişinin yaşam kalitesini düşürebilmekte ve psikolojisini kötü olarak etkilemektedir

(2). Tedavide oral olarak alınan ya da topikal uygulanan sistemler, fotoelektrik tedavi ya da kimyasal peelingler kullanılmaktadır (23).



Şekil 2.2 : Yüzde görülen akne vulgaris

2.3. ZENCEFİL (*ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE*) BİTKİSİ

Zencefil (*Zingiber officinale Roscoe*) bitkisi Çin tıbbı, Ayurveda ve Doğu tıbbında geleneksel olarak kullanılan bir bitkidir. Kuru ve yaş olarak bitkinin rizomları kullanılmaktadır. Zingiberaceae familyasında yer almaktadır (24).

2.3.1. Botanik Özellikleri

Zencefil bitkisi Zingiberaceae familyasına ait olan ve kökeni Güneydoğu Asya olan bir bitkidir. Bitkinin yer altı rizomları kullanılmaktadır (25). Zencefilin, taze veya kurutulmuş olarak kullanımı bulunmaktadır (26).



Şekil 2.3: Zencefil bitkisine ait rizomlar

2.3.2. Kimyasal İçerik

Gingeroller ve shoagoller de dahil olmak üzere birçok aktif bileşen zencefil bitkisinde yer almaktadır (5).

Zencefilin kendine has bir aroması bulunmaktadır. %1-%3 oranlarında uçucu yağ içermekte ve uçucu yağlardan kaynaklanan isabolene, zingiberene ve zingiberol aktif bileşenleri bu aromayı sağlamaktadır. Acı tadı ise içeriğinde bulunan uçucu olmayan gingeroller, shoagoller, paradoller ve zingeronler sağlamaktadır (27).

Gingeroller, rizomda en çok bulunan ana aktif bileşendir. Özellikle (6)-gingerol (5-hydroxy-l-(4′-hydroxy-3′-methoxyphenyl) decan-3-one) 1 en çok bulunan gingeroldür. Gingerolün dehidrate formu olarak başka bir homolog seri olan shoagoller ise özellikler kurutulmuş zencefilde yoğun olarak bulunan aktif bileşenlerden birisidir (5).

2.3.3. Farmakolojik Özellikler

Geniş kullanım alanına sahip tıbbi bir bitkidir (26). Karakteristik kokusundan dolayı baharat olarak ve geleneksel tıpta birçok alanda kullanıldığı eski kaynaklarda yer almaktadır (28). Geleneksel Çin tıbbında, Ayurveda'da ve Batı'da bitkisel tıp uygulamalarında kullanımı mevcuttur. Geleneksel Çin tıbbında baş ağrısı, mide bulantısı ve soğuk algınlığı gibi tedavilerde kullanılırken, Ayurveda ve Batı'daki tıp uygulamalarında artrit, romatizmal hastalıklar ve kas ağrılarındaki tedavilerde sıklıkla kullanılır.

Gebelikte karşılaşılan mide bulantısı ve kusmada, bazı kanser türlerinde ve kardiyovasküler hastalıklarda kullanıldığı da bilinmektedir. Antienflamatuvar ve antibakteriyel ajan olarak kullanımı da mevcuttur (29).

İçerdiği (6)-Gingerol 1 aktif bileşeninin analjezik, antienflamatuvar, antipiretik, gastroprotektif ve kardiyotonik etkilere sahip olduğu çalışmalarda yer almaktadır (5).

2.4. ZENCEFİL UÇUCU YAĞI

Zencefil uçucu yağı, *Zingiber officinale Roscoe* (zencefil) bitkisinin rizomlarından elde edilen spesifik kokulu esansiyel uçucu yağdır. Zencefil uçucu yağında birçok bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenler rizom kaynağına, rizomun kuru veya yaş olmasına ve ekstraksiyon yöntemlerine göre değişiklik gösterebilmektedir (30).

2.4.1. Elde Edilme Yöntemleri

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden elde edilen sıvı ekstraktlardır ve birçok farklı elde edilme yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler uçucu yağın biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerini etkiler. Uçucu yağlarda sıklıkla kullanılan uçucu yağ elde etme yöntemleri distilasyon ve solvent ekstraksiyonudur (31). Zencefil uçucu yağı elde etmek için de ekstraksiyon ve damıtma yöntemleri kullanılabilir. Ekstraksiyon yöntemleri olarak ise maserasyon ve ultrasonik kullanılmaktadır. Ultrason ile ekstraksiyon süresi kısaltılıp verim arttırılabilirken maserasyon ile termal olmayan bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılabilir (32).

Mesomo M. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada zencefil uçucu yağı elde etmek için süperkritik CO_2 çözücü olarak kullanılan süperkritik ekstraksiyon ve hidrodistilasyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. Aktif bileşen ve verim açısından değerlendirildiğinde en yüksek verim süperkritik ekstraksiyonda alınmıştır (33).

2.4.2. Uçucu Yağın Bileşenleri

Zencefil uçucu yağı, zencefil bitkisinin rizomlarından elde edilen tıbbi aromatik bir yağdır. Yağın içerisindeki bileşenlerin miktarı; bitkinin hangi bölgeden toplandığı, rizomların tazelik durumları, toplanma yöntemleri gibi etkenlerden dolayı farklılık gösterebilir. Zencefil uçucu yağının biyolojik aktivitesi ve etkinliği içeriğindeki kimyasal bileşenlere bağlı olduğundan dolayı yağın standardize olması büyük önem arz etmektedir (34). İçeriğinde 400'den fazla bileşen bulunan kompleks bir yapısı bulunmaktadır. Şartlara göre değişiklik

gösterse de zingiberene, -β-cedrene, farnesene, α-curcumene ve β-elemene bileşenleri zencefil uçucu yağının içerisinde en yüksek oranda bulunabilen bileşenlerdir (35).

Yapılan çalışma sonuçlarına göre zencefil uçucu yağının içerisindeki bileşenlerin çok fazla olması sebebiyle antimikrobiyal, analjezik, antiülser, antienflamatuvar, sakinleştirici gibi birçok etkisinin olduğu görülmüştür (34). Yapılan bazı çalışmalarda zencefil uçucu yağının *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinde**,** bakteriyel hücre zarında hasara yol açarak bakteriyel metabolit aktivitenin azalmasına ve sonuç olarak da bakteri ölümlerine sebep olarak antimikrobiyal özellik gösterdiği görülmüştür (36).

2.4.3. Antimikrobiyal ve Antiviral Etkiler

Bellik Y. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada antimikrobiyal olarak incelendiğinde zencefil uçucu yağının içerisindeki bileşenlerin *Escherichia coli, Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* karşı etkili olduğu görülmüştür (37).

Zhang C. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise zencefil uçucu yağının *Shewanella putrefaciens'*e karşı etkili olduğu ve antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir (38).

Foustine ve arkadaşlarının yapmış olduğu zencefil uçucu yağı kullanılarak yapılan bir çalışmada ise %25, %50 ve %100 konsantrasyonlarındaki zencefil uçucu yağlarının *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhi* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkileri çalışılmıştır ve doza bağlı olarak önemli ölçüde etkili olduğu görülmüştür (39).

2.4.4. Zencefil Uçucu Yağının Topikal Kullanımı

Zencefil rizomlarında, 400'den fazla kimyasal bileşen bulunmaktadır. Bu bileşenlerden gingeroller, shogaoller, zingeronlar, gingerdioller, gingerdion ve paradollerin zencefilin farmakolojik etkisinde önemli yeri bulunmaktadır (40).

Zencefilin halk arasında mutfaklarda baharat olarak ve geleneksel tıpta pek çok kullanımı vardır. Fakat bunların çoğu zencefilin oral olarak kullanılması şeklindedir. Son dönemlerde zencefil uçucu yağının topikal olarak da kullanımı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (41).

Zencefil uçucu yağının antibakteriyel, antifungal, analjezik, antiinflamatuar, antiülser, immünomodülatör ve rahatlatıcı etkileri yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır (42).

Zencefilin yapısında bulunan kimyasal bileşenler; COX ve LOX yolları aracılığıyla prostaglandinlerin inhibisyonu, antioksidan aktivite, transkripsiyon faktörü nf-kB'nin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalarla kronik inflamatuar hastalıklarının semptomlarını azaltmada etkili olabilmektedir (40).

Yapılan bir çalışmada Birjand Tıp Bilimleri Üniversitesi'ne bağlı romatoloji kliniğine başvuran 90 osteoartrit hastası seçilmiştir. Hastalardan randomize olarak üç ayrı grup seçilmiştir. Bu gruplar; zencefil uçucu yağıyla masaj, susam uçucu yağıyla masaj ve masaj yapılmayan kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda hem zencefil uçucu yağıyla masaj yapılan osteoartritli hastalarda hem de susam yağıyla masaj yapılan osteoartritli hastalarda eklem ağrısının ve eklem sertleşmesinin iyileşmesinde etkili olduğu görülmüştür. Hatta zencefil uçucu yağının susam yağına göre osteoartritli hastalarda eklem sertliğini iyileştirmede daha etkili olduğu ve daha stabil olduğu görülmüştür (43).

2.5. TOPİKAL İLAÇ UYGULAMA YOLU

Deri hastalıkları, dünya genelinde her yaş grubunda milyonlarca kişide görülen, kişileri sosyal ve ruhsal olarak etkileyen, genellikle ölümcül olmayan hastalıklardır. Deri hastalıklarının tedavisinde topikal formülasyonlar sıklıkla kullanılmaktadır (44).

Topikal ilaç uygulama sistemleri; tedavi edici etkin maddelerin, yardımcı maddeler veya diğer farmasötik inaktif bileşenlerle birleştirilerek oluşturulmuş bileşiklerin deri, göz, burun ve vajinal boşluk gibi vücudun yüzeysel bölgelerine uygulanmasıdır (45).

Topikal formülasyonlar, koruyucu, tedavi edici ve kozmetik amaçlarla kullanılan deriyi hedefleyen formülasyonlardır (46). Derinin yapısında yabancı maddelerin geçişine karşı direnç gösterecek şekilde bariyerler bulunmaktadır. Topikal yöntemler bu deri bariyerlerini seçici olarak aşmayı hedefler (47). Topikal ilaç uygulama yöntemleri ile ilacın epidermal tabakayı geçip kontrollü bir hızda sistemik dolaşıma katılması sağlanır (48). Topikal tedavinin etkinliği partikül boyutu, dağılımı, dağılım katsayısı, dozaj formunun viskozitesi, deri geçirgenliği gibi pek çok fizikokimyasal özelliğe bağlıdır (44).

Sistemik ilaç uygulama yöntemlerine göre, uygulanan ilacın hedef olmayan organlara minimum veya hiç ulaşmaması ile birlikte toksisitenin azalması topikal ilaç uygulamasının en önemli avantajlarından birisidir. Topikal uygulama yönteminin basit ve kolay oluşu ve uygun fiyatlı oluşu bu ilaç uygulama yöntemlerinin avantajlarından bazılarıdır (48). İstenilen bölgeye ulaşabilen ilaç miktarının arttırılabilmesi, hidrofilik ve hidrofobik ilaçların kolayca

uygulanabilmesi, doz aşım riskinde azalma, biyoyararlanımda artış, her yaştan hastaya kolaylıkla uygulanabilmesi, ilaç salımının daha kolay sonlandırılması topikal ilaç uygulama yöntemlerinin diğer avantajlarındandır (44).

Topikal ilaç uygulama yöntemlerinde, yarı katı preparatlar, sıvı preparatlar ve spreyler gibi farmasötik formlar kullanılır. Jeller, kremler ve merhemler topikal uygulama yöntemlerinde en çok tercih edilen farmasötik formlardır (48).

2.5.1. Krem, Merhem ve Jellerin Genel Özellikleri

Kremler, bir veya daha fazla etkin maddenin uygun bir bazda çözülmesiyle oluşturulmuş yarı katı formülasyonlara krem denir. Yağ/su ve su/yağ olarak sınıflandırılırlar. Su bazlı kremler daha hafif, kozmetikte kullanımı daha yaygın olan ve yıkanması daha kolay olan formülasyonlardır. Yağ bazlı kremler ise nemlendirici etkisinin yüksek olması nedeniyle derideki su kaybının daha az olduğu formülasyonlardır (49). Deriye topikal olarak uygulanırlar. İçerisindeki etkin maddenin derinin veya mukoza zarının alt tabakasına iletilmesi için lokalize olarak uygulanmaktadır (50). Kremlerin farmasötik ve kozmetik alanlarda çok çeşitli kullanımları vardır. İyileşme süreçlerini hızlandırmak, yara ve yanıkların iyileşmesi, yarayı bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarından korumak, temizleme, kozmetik, nemlendirme ve güzelleşme gibi amaçlarla kremlerin kullanımları bulunmaktadır (51). Basit ve kolay kullanımı, ilk-geçiş etkisine uğramaması, minimal adsorbsiyon ve günlük düşük dozlarda etkili olması kremlerin avantajlarından bazılarıdır (52).

Merhemler, deriye, mukoza zarlarına ve yaralara uygulanabilen uygun bir bazla birleştirilmiş yarı katı formülasyonlardır. Merhemlerin; koruyucu, kayganlaştırıcı ve topikal olarak tedavi edici rolleri bulunmaktadır (53). Opak veya yarı saydam görünüşlüdür. Deriyi yumuşatan, pürüzsüzleştiren, yağlayan etkileri bulunmaktadır. Viskoz ve yağlı bir yapıdadır. Kremden farklı olarak buharlaşma veya emilme eğiliminde değildirler. Merhemlerin deri yüzeyine uygulanmasıyla deri yüzeyinde tıkayıcı bir tabaka oluşur. Tıkayıcı etkilere sahip olması aktif ilacın penetrasyonunun artmasını sağlar (54). Merhemlerin, kullanım kolaylığı, yan etkinin az olması, hızlı etki, kararlı özellikleri, iyi çözünmesi, güvenli olması, bazın esnekliğinin yüksek olması gibi avantajları bulunmaktadır. Merhemin büyük çoğunluğunu oluşturan baz, merheme belirli fizikokimyasal özellikler kazandırır. Bazlar; yağlı, emülsiyon tipi ve suda çözünebilir olarak sınıflandırılabilir. Emülsiyon tipi bazlar ilacın transdermal emilimini kolaylaştırırlar. Emülsiyon tipi bazlar yağ/su, su/yağ ve su/yağ/su şeklinde olabilir.

Emülsiyon olarak yağ/su kullanıldığı formülasyonların transdermal absorbsiyonu daha yüksektir (53).

Topikal jeller, doğal veya yarı sentetik kaynaklardan oluşturulan ve üç boyutlu hidrofilik veya hidrofobik polimerik bir matris içerisinde etkin maddenin eklenerek oluşturulmasıyla ortaya çıkan yarı katı formülasyon çeşididir (55). Topikal jeller; ağrı ve iltihap giderici, antifungal ve antimikrobiyal, yara iyileşmesi, kozmetik ve estetik uygulamalar, oftalmik jeller, ağız ve diş bakımı, saç ve saç derisi bakımları, lokal anestezi, antiviral tedavi, psoriasis ve seboreik dermatit ve yara izi önleyici tedavilerde kullanılabilirler. Hidrojeller, organojeller, in situ jeller ve emüljeller jel çeşitleridir. Jellerin yağsız olmaları, kolayca sürülebilir olmaları ve ilaç salımını sürdürebilmeleri yönleriyle avantaj sağlamaktadır (56). Daha az yağlı olması ve deriden hızlı bir şekilde uzaklaştırılabilmesi sayesinde krem ve merheme göre daha iyi ilaç uygulaması sağlamaktadır (57).

2.5.2. Formülasyon Seçiminde Dikkat Edilecek Faktörler

Topikal yol, etkin maddenin topikal olarak uygulanan üründen lokal olarak hedeflenen bölgeye nüfuz etmesi ve etkinin sağlanması için kullanılan iletim şeklidir. Deride bulunan katmanlar topikal olarak uygulanan ürünlerin nüfuzunu zorlaştırır. Bu sebeple topikal taşıyıcı sistemlerde bazı faktörlere dikkat edilmesi gereklidir (58). Topikal taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin etkinliğinin sağlanması en temel amaçtır (59).

Taşıyıcı bileşenler, kullanılan yardımcı maddeler, taşıyıcı-ilaç ve taşıyıcı-deri etkileşimleri etkin maddenin salımını ve deriye nüfuza olan etkisini değiştirebildiğinden dolayı çok önemlidir. Yeni bir topikal formülasyon geliştirilirken formülasyonun *in vitro* davranışları değerlendirilmelidir (60).

Topikal formülasyonlarda çözünürlük, kimyasal stabilite, deriye nüfuz etmesine uygun fizikokimyasal özellikler ve deri tahriş olasılığının düşük olması dikkat edilmesi gereken başlıca faktörlerdir (61).

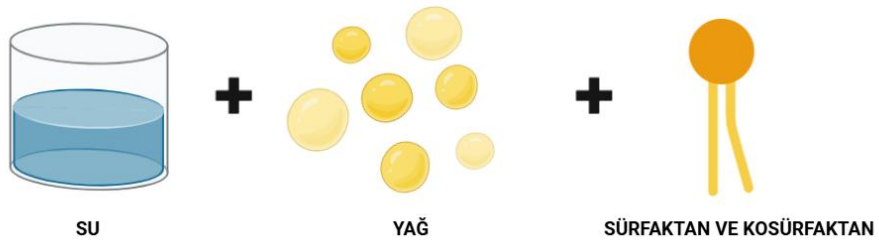
Viskozite de topikal formülasyonlar için önemli bir parametredir. Viskozite, ürünün yayılma hızını ve dolayısıyla ilacın salımını etkiler. Bu sebeple viskozite formülasyonun etkisini ve deriye nüfuzunu etkileyen önemli bir faktördür. Aynı zamanda viskozite formülasyonun stabilitesini de gösterir (62). Bu faktörler formülasyonun etkinliğini ve güvenliğini etkileyen değişkenlerdir (63).

2.6. TOPİKAL YOLLA UYGULANAN YENİLİKÇİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİ

Farmasötik teknolojideki gelişmeler, daha yenilikçi topikal formülasyonların geliştirilmesini sağlamıştır. Bu modern ve yeni formülasyonlar ilaç çözünürlüğünün artmasını, daha uzun süreli stabiliteyi, daha yüksek biyoyararlanımı ve hasta uyuncunun artmasını sağlamaktadır. Farmasötik teknolojideki gelişmeler, kontrollü ve sürekli olarak ilaç salımını sağlayarak uzun süreli terapötik etkiyi ve doz sıklığının azaltılmasını sağlayabilmektedir. Son yıllarda dermal ve transdermal ilaç taşıyıcı olarak nano taşıyıcılar ve polimerik nanopartiküller dikkat çekmektedir. Nano taşıyıcılara örnek olarak nanoemülsiyonlar, nanoemüljeller, lipozomlar, niosomlar ve nanoyapılı lipid taşıyıcılar verilebilir. Nanoemülsiyonlar ve nanoemüljeller topikal ilaç taşıyıcı sistemlerde en çok kullanılan nano taşıyıcılardır (7).

2.7. NANOEMÜLSİYONLAR

Nanoemülsiyonlar, birbirine karışmayan iki sıvının emülgatör ve yardımcı emülgatör eklenmesiyle bir arada tutulan, tek homojen fazlı ve termodinamik olarak kararlı kolloidal dağıtım sistemleridir (64).



Şekil 2.4: Nanoemülsiyon hazırlanması

Yağ- su tipi emülsiyonlardır ve berrak, şeffaf görünümündedirler (65). Nanoemülsiyonlar, kontrollü ilaç iletimi ve hedeflemede aktif maddelerin iletiminde geliştirilen en gelişmiş nanopartikül sistemlerdir (66).

Nanoemülsiyonların emülsiyonlardan farkı sürekli dağılmış fazdaki dağılmış parçacıkların nano boyutta olmaları ve şekilleridir. Nanoemülsiyonlar aktif maddenin dağıtımının iyileştirilmesi için geliştirilen nano boyutta emülsiyonlardır. Nanoemülsiyonların damlacık boyutları 20-200 nm aralığında yer alır (67).

Nanoemülsiyonların karakterizasyon yöntemleri arasında partikül boyutunun ölçülmesi, PDI değerinin belirlenmesi, zeta potansiyelinin ölçülmesi, diferansiyel taramalı kalorimetre, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve transmisyon elektron mikroskobu ile karakterizasyon yer almaktadır (68).

Nanoemülsiyonların çok farklı alanlarda kullanımları mevcuttur. Yağ-Su (Y/S) nanoemülsiyonları hidrofobik ilaçların dağıtımında, gıda endüstrisinde yenilebilir nanoemülsiyonlar, kozmetik endüstrisinde ise aktif maddelerin dağıtımında ve nemlendirme ve kullanım kolaylığı açısından kullanılmaktadır (69).

Nanoemülsyonlar yüksek enerjili ve düşük enerjili yöntem olarak iki grup şeklinde hazırlanabilir. Yüksek enerjili yönteme örnek olarak yüksek basınçlı homojenizasyon ve ultrasonikasyon örnek verilebilir. Bu yöntemler nano boyutta damlacıklar oluşturmak için 10^8 - 10^{10} W/kg gibi çok yüksek enerji harcarlar. Düşük enerjili yöntemler kullanılarak 10^3 W/kg gibi daha az enerji tüketimiyle nanoemülsiyon üretilebilir. Faz ters çevirme sıcaklığı (PIT) ve emülsiyon ters çevirme noktası (EIP) yöntemleri düşük enerjili nanoemülsiyon üretme yöntemlerine örneklerdir. Son dönemlerde, nanoemülsiyon oluşturmak için yağ/su arayüzünde kabarcık patlatma ve buharlaşmalı yaşlandırma gibi yeni yöntemler de geliştirilmiştir (70).

2.7.1. Nanoemülsiyonların Avantajları

Nanoemülsiyonlar, birbirine karışmayan iki farklı sıvının emülgatör eklenmesiyle oluşurlar. Damlacık boyutları genellikle 20-200 nm aralığındadır (71). FDA tarafından genel olarak güvenli kabul edilen ve insan tüketimi için onaylanmış ilaç taşıyıcı sistemleridir (72).

Nanoemülsiyonların geleneksel emülsiyonlara göre pek çok fonksiyonel gelişmiş özelliği bulunmaktadır (73). Nanoemülsiyonların, nano ölçekli boyutta olmaları, yerçekimi ayrışmasına, topaklanmaya ve birleşmeye karşı kararlılık ve stabilite oluşturur ve geleneksel emülsiyonlardan avantajlı olmalarını sağlar. İlaç dağıtımındaki biyoyararlanım, stabilite, çözünürlük gibi büyük sorunların çözümü için etkili olduklarından dolayı farmasötik olarak önemlidirler. Yüzey alanlarının geniş olması ilacın çözünmesi ve emilimi artırır. Yüzey özelliklerinin ayarlanabilir olması da hedefli dağıtım için avantajdır (74).

Nanoemülsiyonların biyolojik membranlardan geçiş kolaylığı sağlaması suda az çözünür olan ilaçların taşınmasını kolaylaştırmıştır. Gelişmiş penetrasyon özellikleri sayesinde kan beyin bariyeri ve göz dokuları gibi zorlu bölgelere ilaç iletimini sağlamayı kolaylaştırmıştır. Termodinamik ve kinetik olarak kararlı olmaları sayesinde nanoemülsiyonların çok fazla

avantajı bulunmaktadır. Hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların taşınmasını sağlamak, arttırılmış biyoyararlanım ve iyileştirilmiş stabilite bu avantajlardan bazılarıdır (75). Aktif farmasötik bileşenin hedeflenmiş organ ve bölgeye ulaştırılmasında nanoemülsiyonlar ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır (76).

Nanoemülsiyonlarda parçacıkların kümelenmesinin engellenmesi, nanopartiküllerin Brown hareketinin emülsiyonların yerçekimi kuvvetini aşmasıyla oluşur (77). Sağlıklı insan ve hayvan hücrelerine zarar vermemesi nedeniyle insan ve hayvanlarda kullanılabilmektedirler. Lipozomlar ve veziküllerin yerine kullanılabilirler (78). Nanoemülsiyonlar taşıyıcı olarak oral, paranteral, topikal ve oküler uygulama yollarında kullanılabilir (79).

Formülasyonlarda biyoyararlanımı arttırmak, tat maskelemesi ve yüzey alanları daha büyük olduğu için emilimi arttırmada kullanılırlar (80). Yapıları sayesinde toksik ve tahriş edici değillerdir. Bu özellikleri sayesinde deride ve mukoza zarlarına rahatlıkla uygulanabilirler. Kimyasal olarak kararsız olan bileşikleri oksidatif ve ışık bozunmasından korur ve stabiliteyi sağlar. Krem, sprey, sıvı gibi çeşitli formlarda nanoemülsiyon çeşitleri oluşturulabilir (81). Nano boyutları sayesinde pürüzlü deri bariyerlerinden kolaylıkla geçebilir ve aktif bileşenin biyoyararlanımının artmasını sağlar (82).

Kozmetik sektöründeki düşük çözünürlük ve kararsızlık gibi sorunlar için de nanoemülsiyonlardan faydalanılabilmektedir. Zhang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada antioksidan özellikli elajik asidin suda zayıf çözünürlüğüne çözüm bulabilmek için yağ-su nanoemülsiyonu çalışılmıştır. Hazırlanan formülasyon incelendiğinde suda çözünürlüğün ve deriden geçişin arttığı ve elajik asitin beyazlatma etkisinin arttığı görülmüştür (83).

2.7.2. Dezavantajları ve Sınırlılıkları

Naneomülsiyonların çok çeşitli umut vadeden avantajları olmasının yanı sıra bazı zorlukları da bulunmaktadır. Hazırlama yöntemlerinin optimizasyonu, uzun vadeli stabilite konularında zorluklar bu dezavantalardan bazılardır (84). Nanoemülsiyonların viskozitesinin düşük olması kalış süresinin az olmasına sebep olabilir (85). Ayrıca nanoemülsiyon formülasyonlarında kararlılığı korumak için büyük miktarlarda yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde kullanılması gerekmektedir. Fazla miktarda yüzey aktif madde kullanılması toksisiteye sebebiyet verebilir. Yüzey aktif maddelerin de toksisitesi dikkate alınmalıdır.

Nanoemülsiyonların yüksek erime noktasına sahip maddeleri çözme kapasitesi de sınırlıdır (86). Farklı çevresel parametreler de nanoemülsiyon kararlılığını etkileyebilen faktörlerdir (87).

2.7.3. Nanoemülsiyon Hazırlama Yöntemleri

Nanoemülsiyon sistemleri düşük veya yüksek enerjili yöntemlerle hazırlanabilir. Yüksek enerjili yöntemlere yüksek basınçlı homojenizasyon, mikro akışkanlaştırma ve ultrasonikasyon örnek olarak verilebilir. Düşük enerjili yöntemlere ise faz inversiyon emülsifikasyon yöntemi ve kendiliğinden nanoemülsifikasyon yöntemi örnektir. Düşük enerjili yöntemler daha verimli olmaları, daha az enerji harcamaları ve daha az karmaşık aletlerin kullanılmasının gerekmesi nedenlerinden dolayı yüksek enerjili yöntemlere göre avantajlıdır. Yüksek enerjili yöntemlerde ise daha az yüzey aktif madde kullanıldığından dolayı gıda emülsiyonlarında tercih edilmektedir (88). Yüksek enerjili sistemler kullanım kolaylığı sebebiyle tercih edilirken, sıcaklıkta bozulan bileşenler için düşük enerjili yöntemler tercih edilir. Yüksek enerji yöntemi büyük yıkıcı etki oluşturmak için karmaşık cihazlar kullanırken, küçük enerji yöntemi nano boyutlu parçalar oluşturmak için sistemin fizyokimyasal özelliklerini değiştirir (89).

Hazırlama yöntemlerinden bazıları şunlardır:

Yüksek Basınçlı Homojenizasyon: Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminde; yağ fazı, su fazı, yüzey aktif madde ve yardımcı maddeler içeren çözeltiye yüksek basınç uygulanır. Homojenizatör cihazıyla yüksek basınç uygulanmasıyla nanoemülsiyon oluşumu sağlanır. Çok fazla enerji kullanımı, seri üretimin zor olması, düşük verimlilik ve çok fazla ısı üretimi bu yöntemin dezavantajlarıdır. Ortalama damlacık boyutu 200 nm altında olan kremler üretilemez ve sadece %20'den az yağ fazı içeren su içinde yağ (o/w) sıvı nanoemülsiyonları üretilebilir (90).

Mikro Akışkanlaştırma: Mikro akışkanlaştırma yönteminde, yüksek basınçlı pozitif deplasmanlı pompa kullanan mikro akışkanlaştırıcı cihazı kullanılmaktadır. Karışım istenilen boyutlara ulaşana kadar mikro akışkanlaştırıcıdan tekrar tekrar dolaştırılır. En son olarak da homojen bir nanoemülsiyon elde etmek için filtreden geçirilir.

Ultrasonikasyon: Bu yöntemde, hazırlanan emülsiyonun boyutlarının nano boyutlara inmesi için ultrasonik frekans uygulanır. Sonikatörün ucu emülsiyonla temas ettiğinde mekanik titreşimler üretir ve bu da kavitasyonu sağlayarak sıvı içerisindeki buhar boşluklarının

çökmesini sağlar. 0,2 μ'den küçük damlacık boyutu oluşturmak istendiğinde bu yöntem kullanılır (91).

Kendiliğinden Emülsifikasyon: Bu yöntemde suyla karışabilen çözücü, yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif maddelerin organik fazdan su fazına doğru hareketinden yararlanılmaktadır. Suyla karışabilen maddelerin sulu faza geçişi, iki fazın arayüzünde akışa sebep olmasıyla birlikte yağ-su arayüzey alanı artar. Bu, çift sürekli mikro emülsiyon fazı bozulduğunda ince yağ damlacıkları kendiliğinden oluşur.

Faz İnversiyon Emülsifikasyon**:** Bu yöntem kendiliğinden emülsifikasyonun gelişmiş versiyonudur. Laboratuvar ölçekli manyetik karıştırıcıda yağ ve yüzey aktif madde karıştırılırken damla damla su eklenir. Su miktarı arttıkça başlangıçta su/yağ emülsiyonu oluşurken damlalar arttıkça tersi olan yağ/su emülsiyonu oluşur (89).

2.7.4. Nanoemülsiyon Karakterizasyonu

Nanoemülsiyonların karakterizasyonu fiziksel ve kimyasal stabilitelerin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Nanoemülsiyonların karakterizasyonu değerlendirilirken damlacık boyutu ve dağılımı ve zeta potansiyeli değerlendirilmektedir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi teknikler kullanılarak boyut ve morfoloji belirlenir. Viskozite, pH, iletkenlik, *in vitro* deri permeabilite çalışmaları, termodinamik stabilite çalışmaları karakterizasyon değerlendirilirken bakılan diğer parametrelerdir (92).

2.7.4.1. Damlacık boyutu ve dağılım: Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutları genel olarak 20-200 nm aralığında ölçülmektedir ve dar boyut dağımı gösterirler (93). Sürekli fazda dağılmış parçacıkların damlacık boyutu ve şekli emülsiyon ve nanoemülsiyon arasındaki temel farktır. Damlacık boyutu ve dağılımı stabiliteyi, çözünürlüğü ve görünümü etkileyen önemli faktörlerdir (94).

2.7.4.2. Zeta potansiyeli: Genellikle zeta potansiyel değerinin yüksek olmasının elektrostatik kararlılığı ifade ettiği kabul edilmektedir. Fakat zeta potansiyelinin sıfıra yakın olması durumu her zaman elektrostatik kararlılık olmadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü bu formülasyonlar elektrostatik mekanizmalar yerine sterik mekanizmalar sayesinde stabilize olmaktadır. Damlacıkların birleşmesini önleyen fiziksel bir bariyer oluşumuyla stabilite sağlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada Cremophor EL ve Tween 80 ve etanol ile hazırlanmış nanoemülsiyon değerlendirilmiştir. Nanoemülsiyonda kullanılan yüzey aktif

maddelerin ve yardımcı yüzey aktif maddenin kısa menzilli çekimi ve birleşmeyi engellediği görülmüştür (95).

2.7.4.3. pH: Nanoemülsiyonlar insan derisine uygulanacağı ve deri tahrişini önlemek için nanoemülsiyonlarda kabul edilebilir pH değeri 5,5-6,5 aralığındadır. Zamanla formülasyonlardaki yağın asidik kimyasallar üretmesi veya suyun bir fazdan başka bir faza geçişi pH değerini değiştirebilmektedir (96).

2.7.4.4. Viskozite: Viskozite, biyoaktif moleküllerin geçirgenliğini ve biyoyararlanımı etkilediği için nanoemülsiyonlardaki önemli parametrelerden biridir (97).

2.8. NANOEMÜLJEL

Hidrofobik veya az çözünür ilaçların iletilmesi, stabilite ve biyoyararlanım gibi sorunlar nedeniyle giderek daha zorlu hale gelmiştir. Bu sorunları ele almak için geliştirilen çeşitli stratejiler arasında nanoemüljeller etkili olduklarını kanıtlamıştır. Nanoemüljellerin makro ölçekteki emüljellerden farkı, bir jel tabanını ve bir emülsiyonu nano ölçekte birleştirilmesidir. Nanoemülsiyon bileşeni, aktif bileşeni hidroliz ve enzimatik bozunma gibi bozucu reaksiyonlardan korur. Bu arada, jel tabanı, sulu fazın viskozitesini artırarak ve yüzey ve arayüzey gerilimini azaltarak emülsiyonun termodinamik stabilitesini artırır (98). Nanoemüljeller, emülsiyon ve jel fazlarının nano boyutlarda birleştirilmesiyle oluşturulmuş olan formülasyonlardır. İlaçlardaki hidrofobik ya da suda çözünürlüğü düşük olan aktif maddelerin çözünürlüğünün az olması, stabilite sorunları ve biyoyararlanım problemlerinin çözümünde naneomüljellerin avantajlarından faydalanılabilmektedir. Nanoemülsiyonlar yapısında bulunan aktif bileşenleri hidroliz ve enzimatik reaksiyonlardan korumaktadır. Nanoemüljelin yapısındaki jel kısmı da viskoziteyi arttırarak yüzey ve ara yüzey geriliminin azaltılmasını ve emülsiyonun termodinamik stabilitesinin artmasını sağlar. Hedeflendirilmiş ilaç dağıtımında da nanoemüljellerden yararlanılmaktadır (99).

2.8.1. Nanoemüljellerin Avantajları

Hazırlanan formülasyonlardaki düşük çözünürlük, stabilite sorunları ve terapötik etkinliğin düşük olması formülasyonlarda karşılaşılan önemli sorunlardandır. Yapılan çalışmada suda az çözünür olan flufenamik asidin çözünürlüğünü, etkinliğini ve stabilitesini arttırmak için naneomüljel olarak formülasyon hazırlanmıştır. Çalışma sonucunda topikal hazırlanan flufenamik asit yüklü nanoemüljelin topikal kullanımındaki etkinliğinin arttığı,

piyasadaki diğer formülasyonlara göre antienflamatuvar etkisinin önemli derecede arttığı ve stabilitesini koruyabildiği görülmüştür. Bu çalışma sudaki çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünün artması için yol gösterici olmaktadır (100).

Uçucu yağların da transdermal geçirgenlik artırıcı özelliği ve toksik olmamaları nedeniyle umut vadetmektedir. Fakat sudaki çözünürlüklerinin düşük olması uçucu yağların kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Nananoteknolojiden yararlanılarak nanomüljel şeklinde formüle edilmesiyle uçucu yağların etkinliğinin arttırılması amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmada diklofenak sodyum ve kimyon uçucu yağı içeren nanoemüljel formülasyonun etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hazırlanan naneomüljel formülasyonun basit jel ve piyasadaki diğer formülasyonlara göre daha yüksek ağrı kesici etki gösterdiği ve transdermal geçirgenliğin arttığı görülmüştür (101).

Yapılan bir çalışmada suda az çözünür olan flufenamik asidin geleneksel formülasyonlarda olan sınırlı olan deri penetrasyonu ve terapötik etkisini nanoemüljel sistemi kullanılarak çözünürlüğü, stabiliteyi ve antienflamatuvar aktiviteyi arttırmak amaçlanmıştır. Sonuç olarak nanoemüljel sistemi kullanılması, çözünürlüğü, stabiliteyi ve sürekli ilaç salımını iyileştirdiği görülmüştür (102).

Yapılan başka bir çalışmada ise citronella uçucu yağının sivrisinek kovucu olarak kullanımında uçucu yağının uçuculuğunu geciktirmek için nanoemüljel ve nanoemülsiyon formülasyonları halinde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda nanoemüljel formülasyonunun, uçucu yağın salımını 24 saat uzattığı ve nanoemülsiyonlara göre selüloz asetat membran yoluyla geçirgenlik yüzdesini büyük ölçüde azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak nanoemüljel kullanımı uçucu yağların derite daha uzun süre kalmasını ve deriyi korumayı sağladığı ve potansiyel bir formülasyon olduğu görülmüştür (103).

Uçucu yağların düşük suda çözünürlükleri nedeniyle çözünürlükleri ve etkileri sınırlıdır. Morteza ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada diklofenak sodyum içeren nanoemüljel sistemlerine kimyon uçucu yağı eklenerek transdermal geçirgenlik yeteneğinin artırılması amaçlanmıştır. Kimyon esansiyel nanoemülsiyonu Tween 80 ve Tween 20 ile hazırlanmış ve Carbopol jel matrisine dahil edilmiştir. Hazırlanan nanoemüljeldeki diklofenağın transdermal geçirgenlik değerinin basit jele ve piyasadaki ürünlere göre yükseldiği görülmüştür. Kimyon uçucu yağı içeren nanoemüljel formülasyonunun, ilaçların tedavi edici etkisini artırmada umut vaat ettiği görülmüştür (104).

Vitis vinifera yağı kullanılarak yapılmış başka bir çalışmada ise sürfaktan olarak Tween 80 ve Span 80 ile nanoemülsiyon oluşturulmuştur. Hazırlanan nanoemülsiyona da carbopol hidrojeli eklenerek nanoemüljel oluşumu sağlanmıştır. B16-F1, Hep-3B, LX-2 ve HeLa hücre hatlarını içeren antikanser aktiviteleri ve antienflamatuvar aktiviteleri üzerinde çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak nanoemüljelin aktivitesinin yağın aktivitesine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (105).

2.8.2. Nanoemüljellerin Dezavantajları

Nanoemülsiyon üretiminde yüksek enerji gerektiren yaklaşımların kullanılmasından kaynaklanan ölçeklenebilirlik ve termodinamik kararsızlık sorunları nedeniyle nanoemüljellerin büyük ölçekli uygulaması sınırlıdır. Emüljelde kullanılacak güvenli yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif maddelerin seçimi sınırlıdır. Kullanılacak olan yüzey aktif maddenin fazla olması deride kontakt dermatit, eritem, deride kızarıklık, deri tabakası bozulması gibi rahatsızlıklara sebep olabilir. Jelleştirici maddenin pH ve sıcaklık değişimlerine karşı yüksek duyarlılığı, jel yapısının bozulmasına ve kimyasalların sızmasına yol açabilir (106).

2.8.3. Nanoemüljel Karakterizasyonu

Nanoemüljel formülasyonlarının karakterizasyonu kapsamında, temel fizikokimyasal ve uygulamaya yönelik özellikler değerlendirilir. Bu doğrultuda, nanoemüljeli oluşturan nanoemülsiyon sistemine ait damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri belirlenir. Ayrıca, elde edilen nanoemüljel formülasyonunun pH değeri ölçülür; reolojik özellikleri ve viskozite davranışı incelenir. Bunun yanı sıra, formülasyonların yayılabilirlik ve biyoadezyon özellikleri değerlendirilerek topikal uygulamaya uygunlukları ortaya konulur. Son olarak, geliştirilen nanoemüljel sistemlerin etkinliğini belirlemek amacıyla in vitro çalışmalar gerçekleştirilir (107).

2.8.4. Nanoemüljel Hazırlanma Yöntemleri

Hazırlanan nanoemülsiyona jel haline gelebilmesi için jelleştirici madde eklenir. Carbopol, sodyum karboksimetil selüloz, Pluronic F127 ve Guar zamkı gibi jelleştirici maddeler nanoemülsiyona eklenerek nanoemüljel oluşturulur.

2.9. KOZMETİK VE FARMASÖTİK UYGULAMA ALANLARI

İlaç, kozmetik ve gıda gibi çok çeşitli alanlarda kullanımı bulunmaktadır (93). Kullanım alanlarından bazıları şöyledir:

2.9.1. İlaç

Hedefe yönelik ilaç taşınımının sağlanması, stabilite, ilaç salım süresinin artması ve yüksek biyoyararlanım gibi avantajlarından dolayı nanoemülsiyonlar ilaç sektöründe büyük umut vadetmektedir. Kanser ilaçlarının etkinliğinin artırılması, göz içi ilaç uygulamalarında ilaç dağıtımının iyileştirilmesi ve burun içi uygulama yoluyla beynin hedeflenmesi gibi kullanım alanları olabilmektedir (108). Nanoemülsiyonların oral, paranteral, dermal, mukozal, intradermal, nazal, oküler gibi çok farklı uygulama yollarının olması nanoemülsiyonları cazip kılmaktadır (109).

2.9.2. Kozmetik

Nanaoemülsiyonların estetik özellikleri, şeffaf görsel görünümleri, düşük viskoziteleri ve yüksek yüzey alanları sayesinde aktif maddenin etkili şekilde taşınması kozmetik alanında kullanımını cazip kılmaktadır. Emülsiyonlarda görülen krema oluşumunun, çökelmenin ve topaklanmanın nanoemülsiyonlarda gözlenmemesi emülsiyonlara göre avantaj sağlamaktadır. Nanojel teknolojisi transepidermal su kaybını en aza indirmeyi ve deri korumasını artırmayı sağlar. Güneş koruma ürünleri, yaşlanma karşıtı özellikli ürünler ve nemlendirici ürünlerde özellikle umut vadetmektedir (110). UV korumasını, deri penetrasyonunu, rengi, koku salımını ve bitiş kalitesini iyileştirmek için nanoemülsiyonlar kullanılmaktadır. Bölgeye özgü etki sağlanması, aktif bileşenlerin iletiminin kontrol edilebilmesi, etki süresinin uzatılması, ilaç yüklemesini arttırmak gibi özellikleri sayesinde kozmetik alanında deri bakımı, saç bakımı ve tırnak bakımı gibi pek çok alanda kullanımı bulunmaktadır (111).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇ

Çalışmada kullanılan Tween 80 (Polysorbate 80) (Sigma-Aldrich, ABD) temin edilmiştir. Transcutol (Gattefossé, Fransa) temin edilmiştir. Zencefil uçucu yağı (Botalife, Türkiye) temin edilmiştir. Jelasyon için Carbopol 934 (Lubrizol, ABD) kullanılmıştır. Trietanolamin (TEA) (Sigma-Aldrich, ABD) temin edilmiştir. Hyalüronik asit (Sigma-Aldrich, ABD) tarafından sağlanmıştır. Distile su Milli-Q Direct-Q 3 UV (Merck Millipore, ABD) cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan Aletler

Tablo 3.1: Kullanılan aletler ve marka, modelleri

Kullanılan Aletler	**Marka, Model**
Hassas Terazi	OHAUS, PA224C Analitik Terazi 220g/0.0001g
Manyetik Karıştırıcı	IKA, RT10 Manyetik Karıştırıcı
Distile Su Cihazı	Millipak Express20 Direct-Q 3UV
Damlacık Büyüklüğü Ölçümü ve İletkenlik Ölçüm Cihazı	Zetasizer, Nano-ZS
Santrifüj Cihazı	SIGMA, Santrifüj 1-14K
Sonikatör Cihazı	Sonics Vibra-Cell CV188, Sonics & Materials
pH metre	Mertler Toledo SC S210-Uni
Viskozite Cihazı	Thermo Scientific, Haake RheoStress 1

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Tablo 3.2: Kullanılan malzemeler ve firma isimleri

Kullanılan Malzemeler	Firma
Cam malzemeler (beher, erlen, baget)	ISOLAB
Enjektör	Beybi
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Parafilm	ISOLAB
Spatül	Balmumcu kimya
Manyetik balık	ISOLAB
Flakonlar	ISOLAB

3.2. UÇUCU YAĞ ANALİZİ

Zencefil uçucu yağının kimyasal bileşimi, GC-FID/MS analizi kullanılarak belirlendi. Uçucu yağın kimyasal bileşiklerini tanımlamak ve nicelendirmek için Agilent 7890B GC-FID (Santa Clara, CA, ABD) kullanılmıştır. İki yönlü bir kılcal ayırıcı vasıtasıyla Agilent 5977E elektron darbe kütle spektrometresine (Santa Clara, CA, ABD) bağlanmıştır. 1 µL numuneyi enjekte etmek için Agilent G4513A (Santa Clara, CA, ABD) otomatik enjektör kullanılmıştır. DB-WAX kolonu (60m, 0.25mm, 0.25µm) ile aşağıdaki sıcaklık programı kullanılmıştır: 15 dakika boyunca 70 °C, ardından 2 °C/dakika hızla 180 °C'ye yükseltilmiştir. Kolon sıcaklığı, beş dakika boyunca 180 °C'lik izotermal sıcaklıkta tutulduktan sonra, dakikada 5 °C'lik bir artışla 230 °C'ye yükseltilmiştir. Daha sonra, 15 dakika boyunca 230 °C izotermal kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Analiz için 100 dakika ayrılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak, 1,5 mL/dakika sabit akış hızında helyum kullanılmıştır. 1:50'lik bir bölme oranı seçilmiştir. Enjektör portu, kuadrupol, MSD transfer hattı, iyon kaynağı ve FID'nin sıcaklıkları sırasıyla 220 °C, 150 °C, 250 °C, 230 °C ve 220 °C olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV'de ve 45-450 m/z kütle aralığında kaydedilmiştir. FID hava akışı 400 mL/dak iken, H2 akışı 30 mL/dak olarak programlanmıştır (112).

Wiley Kütle Spektral Veri Kayıt Defteri, 9. baskı (Nisan 2011)'den elde edilen bileşiklerin kütle spektrumları, NIST 11 Kütle Spektral Kütüphanesi (NIST11/2011/EPA/NIH) ile karşılaştırılarak, uçucu yağın kimyasal bileşikleri tanımlanmıştır. GC-FID/MS'de, aynı çalışma parametreleri altında üç farklı eşzamanlı otomatik enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. FID verileri kullanılarak, DB-WAX kolonundaki bileşiklerin bağıl tutunma indekslerine (RRI) dayalı tanımlama tekniği, doymuş n-alkan serisine (C7-C40) karşı hesaplandı (113). Sonuçları değerlendirmek için NIST çevrimiçi web kitabı ve literatürdeki önceki araştırma verileri kullanıldı.

3.3. NANOEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Formülasyon geliştirme çalışmalarından önce gerçekleştirilen ön formülasyon aşamasında, uçucu yağ ile yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde oranlarının sistem özellikleri üzerindeki etkisi kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, uçucu yağın toplam yüzey aktif madde miktarına oranı 2,5:1 olacak şekilde sabit tutulmuş ve farklı kompozisyonların oluşturulmasına olanak sağlanmıştır. Uçucu yağ konsantrasyonu %0,5 ile %5 arasında değişecek şekilde toplam on iki farklı formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu formülasyonların içerik ve oranlarına ilişkin detaylar Tablo 3.3'te sunulmaktadır.

Nanoemülsiyon sistemleri, zencefil uçucu yağının sulu faz içerisinde uygun şekilde dağılması esasına dayanmaktadır. Bu kapsamda, zencefil uçucu yağı damıtılmış su içerisinde yüzey aktif madde olarak Tween 80 kullanılarak homojen şekilde disperse edilmiştir. Formülasyonların hazırlanması sırasında, sistem stabilitesini ve damlacık boyutunu optimize etmek amacıyla farklı yüzey aktif madde konsantrasyonları denenmiş ve bu parametrenin nanoemülsiyon karakteristikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Elde edilen formülasyonların fizikokimyasal özellikleri; damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi temel parametreler açısından değerlendirilmiştir. Bu analizler sonucunda, dar boyut dağılımı, uygun yüzey yükü ve istenen partikül boyutu özelliklerini sergileyen formülasyonlar belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalı değerlendirmeler neticesinde, NE5 ve NE11 kodlu nanoemülsiyon formülasyonları en uygun özellikleri göstermeleri nedeniyle optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir.

Tablo 3.3: Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonları

Nanoemülsiyon Formülasyonları	Uçucu yağ (%)	Kosürfaktan (%)	Sürfaktan (%)	Distile Su (%)	Sürfaktan: Kosürfaktan	Uçucu yağ: Total Sürfaktan
NE1	0,5	0,14	0,07	99,29	1:2	2,5:1
NE2	1	0,26	0,13	98,61	1:2	2,5:1
NE3	2	0,53	0,26	97,21	1:2	2,5:1
NE4	3	0,8	0,40	95,80	1:2	2,5:1
NE5	4	1,06	0,53	94,41	1:2	2,5:1
NE6	5	1,33	0,66	93,01	1:2	2,5:1
NE7	0,5	0,07	0,14	99,29	2:1	2,5:1
NE8	1	0,13	0,26	98,61	2:1	2,5:1
NE9	2	0,26	0,53	97,21	2:1	2,5:1
NE10	3	0,4	0,8	95,80	2:1	2,5:1
NE11	4	0,53	1,06	94,41	2:1	2,5:1
NE12	5	0,66	1,33	93,01	2:1	2,5:1

Tablo 3.4: 5 g ön formülasyon hazırlanması için gereken madde miktarları (g)

Nanoemülsiyon Formülasyonları	Uçucu Yağ	Kosürfaktan	Sürfaktan	Distile Su
NE1	0,025	0,007	0,0035	4,9645
NE2	0,05	0,013	0,0065	4,9305
NE3	0,1	0,0265	0,013	4,8605
NE4	0,15	0,04	0,02	4,79
NE5	0,2	0,053	0,0265	4,7205
NE6	0,25	0,0665	0,033	4,6505
NE7	0,025	0,0035	0,007	4,9645
NE8	0,05	0,0065	0,013	4,9305
NE9	0,1	0,013	0,0265	4,8605
NE10	0,15	0,02	0,04	4,79
NE11	0,2	0,0265	0,053	4,7205
NE12	0,25	0,033	0,0665	4,6505

3.4. NANOEMÜLSİYON HAZIRLANMASI

Nanoemülsiyon formülasyonları, yüksek enerjili emülsifikasyon yöntemlerinden biri olan ultrasonik emülsifikasyon tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Yağ ve su fazlarının etkin bir şekilde birleştirilmesini sağlamak amacıyla yüzey aktif madde olarak Tween 80 tercih edilmiş, sistemin stabilitesini artırmak ve arayüzey gerilimini daha da düşürmek amacıyla

yardımcı yüzey aktif madde (kosurfaktan) olarak Transcutol kullanılmıştır. Tüm formülasyonlar her birinden 5 g olacak şekilde hazırlanmıştır.

Formülasyonların hazırlanması aşamasında öncelikle gerekli miktarda distile su, analitik terazide tartılmıştır. Ardından, daha önceden belirlenen ölçülerde Tween 80 ve Transcutol sırasıyla tartılarak aynı faz içerisinde birleştirilmiştir. Elde edilen karışım, manyetik karıştırıcı üzerinde 200 rpm hızda 5 dakika süreyle karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

Ayrı bir kapta tartılan zencefil uçucu yağı, içerisine manyetik karıştırıcı çubuk yerleştirilmiş şekilde karıştırıcının üzerine yerleştirilmiş ve ardından sulu faz, pastör pipeti yardımıyla uçucu yağ içeren faz üzerine damla damla eklenmiştir. Bu sırada karıştırma hızı başlangıçta 200 rpm olarak ayarlanmış, sulu faz ilave edildikçe kademeli olarak artırılarak 1000 rpm'e kadar yükseltilmiştir. 20 dakika boyunca karıştırma işlemi yapılmıştır.

Ön emülsiyon oluşumunun ardından, sistemin nano boyuta indirgenmesi amacıyla ultrasonik homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Hazırlanan emülsiyonlar sonikatör cihazında 70 amplitüd değerinde 10 dakika süreyle işleme tabi tutulmuştur. Elde edilen nanoemülsiyonların homojen dağılım gösterdiği ve ileri karakterizasyon çalışmalarına uygun olduğu gözlemlenmiştir.

3.5. NANOEMÜLSİYONLARIN KARAKTERİZASYONU

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının stabilite ve karakterizasyonu, makroskobik gözlemler ile damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyeli, iletkenlik ve pH ölçümleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.5.1. Makroskobik Analiz

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının fiziksel stabilitesi, ilk aşamada görsel ve makroskobik değerlendirmeler ile incelenmiştir. Bu doğrultuda, sistemlerde faz ayrımı, çökelme, flokülasyon ve kremalaşma gibi fiziksel instabilite göstergelerinin oluşup oluşmadığı dikkatle gözlemlenmiştir.

3.5.2. Damlacık Boyutu, PDI ve Özelliklerinin Belirlenmesi

Formülasyonların detaylı karakterizasyonu kapsamında, damlacık boyutu ve PDI ölçümleri Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş; bu sayede sistemlerin homojenliği ve partikül boyut dağılımının genişliği hakkında ayrıntılı bilgi elde edilmiştir. Ölçüm öncesinde

örnekler 1/10 oranında seyreltilmiş ve ölçüm hücresine alınarak analiz edilmiştir. Her bir formülasyon için en az üç paralel ölçüm yapılmış olup, elde edilen sonuçların ortalaması alınarak değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

3.5.3. Zeta Potansiyeli

Nanoemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyeli ölçümleri, Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesinde örnekler 1/10 oranında seyreltilmiş ve ölçüm hücresine alınarak analiz edilmiştir. Her bir formülasyon için en az üç paralel ölçüm yapılmış olup, elde edilen sonuçların ortalaması alınarak değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Zeta potansiyeli değerleri, nanoemülsiyon sistemlerinin yüzey yükü ve kolloidal stabilitesi hakkında bilgi sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

3.5.4. İletkenlik

Nanoemülsiyon formülasyonlarının iletkenlik ölçümleri, Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler öncesinde örnekler uygun koşullarda hazırlanmış ve analiz için ölçüm hücresine aktarılmıştır. Her bir formülasyon için en az üç paralel ölçüm yapılmış, elde edilen verilerin ortalaması alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir. İletkenlik değerleri, nanoemülsiyon sistemlerinin elektriksel özelliklerinin belirlenmesi ve emülsiyon tipinin (yağ içinde su veya su içinde yağ) tayin edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.5.5. pH Ölçümleri

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının uygun pH aralığında olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, pH ölçümleri formülasyonların hazırlandığı gün gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, pH-metre cihazı kullanılarak yapılmıştır. Her bir formülasyon için en az üç paralel ölçüm yapılmıştır. Her bir formülasyonun pH değeri uygun koşullarda ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar kaydedilerek değerlendirilmiştir. Ölçülen pH değerleri, formülasyonların stabilitesi ve deri ile uyumluluğu açısından yorumlanmıştır.

3.6. NANOEMÜLSİYONLARIN STABİLİTE ÇALIŞMASI

3.6.1. Makroskobik Analiz, Damlacık Boyutu, PDI, pH, Zeta Potansiyeli ve İletkenlik Ölçümleri

Nanoemülsiyon formülasyonlarının fiziksel stabilitesini değerlendirmek amacıyla, hazırlanan sistemler farklı depolama koşulları altında incelenmiştir. Bu kapsamda, formülasyonlar +5°C ve +25°C sıcaklıklarda saklanmış ve belirli zaman aralıklarında analiz edilmiştir.

Stabilite değerlendirmesi kapsamında, formülasyonların hazırlanmasını takiben 0., 1., 2. ve 4. haftalarda önce makroskobik incelemeler gerçekleştirilerek renk değişimi, bulanıklık, faz ayrımı, çökelme ve kremalaşma gibi fiziksel değişiklikler açısından değerlendirilmiş; sonra damlacık boyutu, PDI, pH, zeta potansiyeli ve iletkenlik ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, depolama süresi ve sıcaklığın nanoemülsiyon sistemlerinin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

3.6.2. Santrifüj Testi

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının fiziksel stabilitesini hızlandırılmış koşullar altında değerlendirmek amacıyla santrifüj testi uygulanmıştır. Bu amaçla, her bir formülasyondan 1 mL alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Numuneler, belirlenen koşullar altında 3000 rpm hızında 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında, formülasyonlar faz ayrımı, çökelme, agregasyon (topaklanma) ve kremalaşma gibi instabilite göstergeleri açısından makroskobik olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, nanoemülsiyonların mekanik strese karşı dayanıklılığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.6.3. Termal Test

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının termal stabilitesini değerlendirmek amacıyla kontrollü sıcaklık artışı altında termal stres testi uygulanmıştır. Bu test ile sistemlerde sıcaklık değişimine bağlı olarak oluşabilecek faz ayrımı, çökelme, flokülasyon veya kremalaşma gibi instabilite durumlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, nanoemülsiyon örnekleri başlangıçta 40°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiş ve sıcaklık her 30 dakikada bir 5°C artırılarak kademeli şekilde 80°C'ye kadar yükseltilmiştir.

Uygulanan termal döngü sonrasında formülasyonlar makroskobik olarak değerlendirilmiş ve herhangi bir fiziksel değişim (faz ayrımı, bulanıklık artışı, çökelme veya kremalaşma) açısından incelenmiştir. Elde edilen bulgular, nanoemülsiyon sistemlerinin yüksek sıcaklık koşulları altındaki stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.7. MORFOLOJİK ANALİZ

Nanoemülsiyon formülasyonlarının morfolojik özellikleri, taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla, JEOL (Tokyo, Japonya) marka STEM cihazı ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Analiz öncesinde, nanoemülsiyon örnekleri uygun görüntüleme koşullarının sağlanabilmesi amacıyla saf su ile 100 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerden bir damla, karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında (25°C) kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin ardından gridler cihaz içerisine yerleştirilerek görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen STEM görüntüleri üzerinden nanoemülsiyonların damlacık boyutu ve morfolojisi değerlendirilmiştir. Bu analizler, formülasyonların nano boyuttaki yapısal özelliklerinin doğrulanması amacıyla kullanılmıştır.

3.8. NANOEMÜLJEL HAZIRLANMASI

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonları nano ölçekte karakterize edilmiş ve elde edilen bulgular doğrultusunda uygun formülasyonlar belirlenmiştir. Bu kapsamda, yüzey aktif madde olarak Tween 80 içeren ve fizikokimyasal açıdan en uygun sonuçları gösteren iki nanoemülsiyon formülasyonu (NE5 ve NE11) seçilerek nanoemüljel formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Jel formülasyonunun oluşturulması amacıyla farklı polimerler ile çalışmalar gerçekleştirilmiş olup, jel matrisi oluşturmak için %0,5 Carbopol ve %1,5 hyaluronik asit kullanılmıştır. Polimerler, terazi kullanılarak hassas bir şekilde tartılmış ve seçilen nanoemülsiyon formülasyonlarına yavaş ve kontrollü bir şekilde, sürekli karıştırma altında ilave edilmiştir. Elde edilen karışım, homojen bir yapı elde edilinceye kadar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı kullanılarak 200 rpm hızında yaklaşık 2 saat süreyle homojen olana dek karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin ardından, Carbopol içeren formülasyonların nötralizasyonu ve jel yapısının oluşumunun sağlanması amacıyla pastör pipeti yardımıyla bir damla TEA ilave edilmiş ve karışım son kez homojenize edilmiştir.

Elde edilen nanoemüljel formülasyonları, stabilitelerinin korunması amacıyla +5 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Tablo 3.5: Nanoemüljel formülasyonlarda kullanılan polimerler ve kullanım miktarları (%)

Nanoemüljel Formülasyon Kodu	Kullanılan Nanoemülsiyon	Polimer	Polimer Konsantrasyonu (%)
NEG1	NE11	Hyalüronik asit	1,5
NEG2	NE5	Hyalüronik asit	1,5
NEG3	NE11	Carbopol	0,5
NEG4	NE5	Carbopol	0,5

3.9. NANOEMÜLJEL FORMÜLASYONUNUN KARAKTERİZASYONU

Hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri pH, iletkenlik, viskozite, tekstür, yayılabilirlik ve biyoadezyon analizleri ile değerlendirilmiştir.

3.9.1. pH Ölçümü

Hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının uygun pH aralığında olup olmadığını değerlendirmek amacıyla pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, formülasyonların pH değerleri hazırlandıkları gün içerisinde pH metre kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler sırasında cihazın kalibrasyonu uygun tampon çözeltiler ile sağlanmış ve analizler standart koşullar altında yürütülmüştür.

Her bir formülasyon için en az üç paralel ölçüm yapılmış, elde edilen sonuçların ortalaması alınarak değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

3.9.2. İletkenlik Ölçümü

Nanoemüljel formülasyonlarının elektriksel özelliklerini belirlemek amacıyla iletkenlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, ölçümler Zetasizer cihazı kullanılarak yapılmıştır. Her bir formülasyon için üç paralel ölçüm gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerin ortalaması alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir. İletkenlik değerleri, formülasyonların yapısal özellikleri ve sistem tipinin belirlenmesine katkı sağlamıştır.

3.9.3. Viskozite Ölçümü

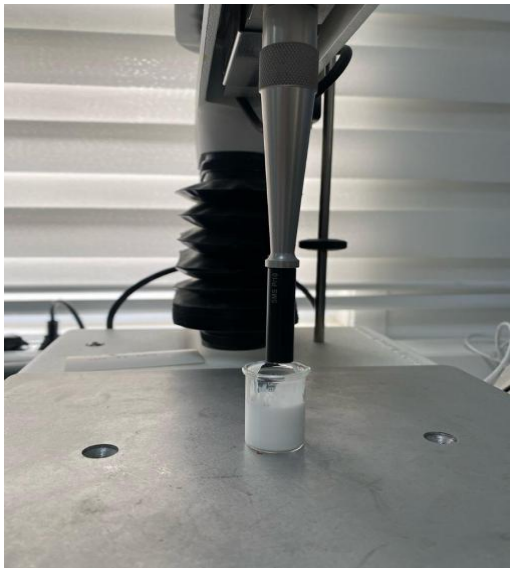
Hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının reolojik özelliklerini belirlemek amacıyla viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, ölçümler koni-plaka tip viskozimetre kullanılarak yapılmıştır. Analizlerde, Brookfield Engineering Laboratories (Middleboro, MA, ABD) tarafından üretilen cihaz ve CP-52 mili kullanılmıştır.

Viskozite ölçümleri 25 °C oda sıcaklığında ve 37,5-375 rpm hız aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, nanoemüljel formülasyonlarının akış davranışlarının ve uygulama sırasında gösterdikleri performansın değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

3.9.4. Tekstür Profil Analizi

Nanoemüljel formülasyonlarının mekanik ve yapısal özelliklerini değerlendirmek amacıyla doku analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, Doku Profil Analizi (Texture Profile Analysis, TPA) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler, Stable MicroSystems (Birleşik Krallık) marka doku profil analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Analiz sırasında formülasyonlara iki ardışık sıkıştırma döngüsü uygulanmış ve elde edilen kuvvet-zaman eğrileri kaydedilmiştir. Bu eğrilerden yararlanılarak sertlik, yayılabilirlik ve yapışma gibi parametreler hesaplanmıştır. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla her bir analiz üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.1: Tekstür profil analizi (TPA)

3.9.5. Yayılabilirlik Ölçümü

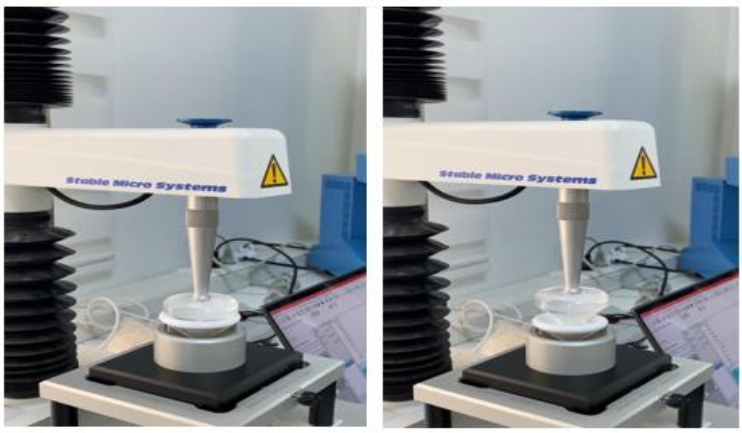
Nanoemüljel formülasyonlarının yayılabilirlik özelliklerini değerlendirmek amacıyla ölçümler tekstür analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, Stable Micro Systems (Godalming, Surrey, Birleşik Krallık) marka doku profil analiz cihazı, konik yayılabilirlik probu ile birlikte kullanılmıştır.

Ölçümler 25 °C oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve her bir formülasyon için analizler üç kez tekrarlanmıştır. Analiz sırasında probun numune içerisine ilerlemesi esnasında elde edilen kuvvet-mesafe eğrileri kaydedilmiş ve değerlendirilmiştir. Bu eğrilerden tepe kuvveti ve kayma işi parametreleri hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, daha düşük tepe kuvveti ve kayma işi değerlerinin formülasyonun daha iyi yayılabilirlik özelliğine sahip olduğunu gösterdiği kabul edilmiştir. Bu yöntem, nanoemüljel sistemlerin yayılabilirlik özelliklerinin değerlendirilmesinde literatürde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir analiz tekniğidir (114).



a. b.



c. d.

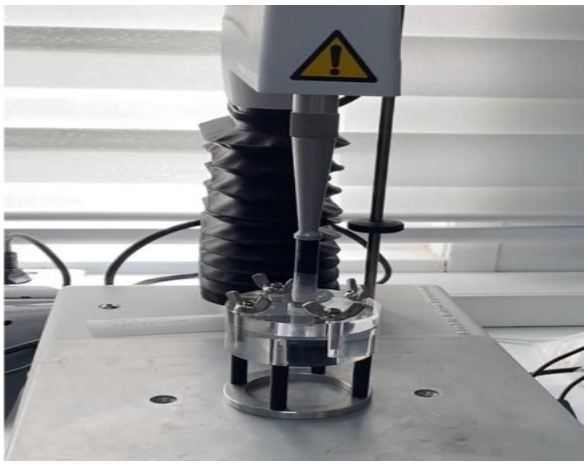
Şekil 3.2: Yayılabilirlik ölçümü (a. Formülasyonun yayılabilirlik özelliğini değerlendirmek için nanoemüljel yüzeye yerleştirilir; b. Konik prob numune üzerinde dik olarak ilerler; c. Konik probun nanoemüljel içerisinde ilerlemesiyle penetrasyon derinliği ölçülür; d. Elde edilen değer yayılabilirlik ölçüsü olarak kaydedilir)

3.9.6. *Ex vivo* Biyoadezyon

Nanoemüljel formülasyonlarının biyoadezif özelliklerini değerlendirmek amacıyla ölçümler tekstür profil analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, Stable MicroSystems (Birleşik Krallık) marka doku profil analiz cihazı kullanılmıştır.

Analizlerde, biyolojik yüzeyi temsil etmek amacıyla yerel bir kesimevinden temin edilen *ex vivo* domuz derisi kullanılmış ve tekstür analiz cihazı probuna sabitlenmiştir. Ardından, prob ile nanoemüljel formülasyonları temas ettirilmiş ve belirli bir süre sonunda geri çekilerek ayrılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında elde edilen kuvvet-zaman eğrileri değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda, formülasyon ile biyolojik yüzey arasındaki maksimum ayırma kuvveti ve yapışma enerjisi hesaplanmıştır. Bu parametreler, formülasyonların biyolojik yüzeylere tutunma kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla her bir analiz üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3: *Ex vivo* biyoadezyon çalışması

3.10. *IN VITRO* ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

3.10.1. Agar Difüzyon Çalışması

Zencefil uçucu yağı ve NE5, NE11, NEG1, NEG2, NEG3, NEG4, E1 ve E2 nanoemülsiyon ve nanoemüljellerinin formülasyonlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228*, Cutibacterium acnes* ATCC 11828'e karşı antimikrobiyal aktivitelerini; *Candida albicans* ATCC 10231'e karşı antifungal aktivitelerini taramak için Kirby-Bauer difüzyon testleri yapılmıştır. Kısaca, yaklaşık 1×10^6 cfu/mL mikroorganizma süspansiyonunun 100 µL'si, *S. aureus, S. epidermidis* ve *C. albicans* için triptik soya agar (TSA) ve *C. acnes* için koyun kanlı agar yüzeyine homojen olarak yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, 10 µg veya µL formülasyon ve %4 zencefil uçucu yağı aseptik koşullar altında agar yüzeyine aktarılmıştır ve bakteriler için 37°C'de (*C. acnes* için %5 CO2 atmosferi altında) ve *C. albicans* için 30°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, mikroorganizmaların formülasyonların etrafında büyümediği alanlar olan inhibisyon bölgeleri gözlemlenmiştir (115).

3.10.2. Mikrodilüsyon Çalışması

Zencefil uçucu yağı ve iki nanoemülsiyonun (NE11 ve NE5) *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *C. acnes* ATCC 11828'e karşı minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC'ler); *C. albicans* ATCC 10231'e karşı antifungal aktiviteleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2000), (CLSI, 2012) tarafından açıklanan mikrodilüsyon tekniği ile belirlenmiştir. *S. aureus ve S. epidermidis* için katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyerinde (CAMHB, Difco Laboratories), *C. acnes* için beyin kalp infüzyon besiyerinde (BHIB) *ve C. albicans* için morfolin propan sülfonik asit (MOPS, Sigma) ile pH 7.0'a tamponlanmış Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 besiyerinde (Sigma) zencefil uçucu yağı ve nanoemülsiyonların seri iki katlı seyreltmeleri, 96 kuyucuklu, U şeklinde, mikrotiter plakalarda (Greiner) 1-1/512 kat arasında yapılmıştır. Gece boyunca kültürlerden alınan aşılar, bakteriler için 5 x 10^5 cfu/mL ve maya için 0,5-2,5 × 10^3 cfu/mL nihai konsantrasyonda kuyucuklara eklenmiştir. Tepsiler buharlaşmayı önlemek için plastik torbalara konulmuştur ve bakteriler için 37°C'de 18-24 saat (*C. acnes* için %5 CO_2 atmosferi altında) ve *C. albicans* için 30°C'de inkübe edilmiştir. MIC'ler, görünür büyümeyi tamamen inhibe eden en düşük antimikrobiyal

konsantrasyonlar olarak tanımlanmıştır ve gerekirse, rezasurin, mor rengi pembeye çevirerek mikroorganizmaların büyümesinin göstergesi olarak kullanılmıştır. Viskoz ve yoğun yapıları nedeniyle, krem ve jel formülasyonlarının tam ve doğru antimikrobiyal aktiviteleri mikrodilüsyon deneyi ile belirlenememiş ve bu testlere dahil edilmemiştir. Çalışmanın standardizasyonu için siprofloksasin *S. aureus* ATCC 29213'e karşı test edilmiştir. Testler iki kez tekrarlanmıştır.

Antimikrobiyal maddelerin *in vitro* bakterisidal aktiviteleri, Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (NCCLS, 1999) tarafından belirlenmiştir. Bu amaçla, MIC belirleme sırasında gözle görülür büyümenin olmadığı kuyulardan 2 × 10 µL'lik örnekler alınarak TSA plakalarına aşılanmıştır. MBC'ler, agar yüzeyinde mikrobiyal büyümeye izin vermeyen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonlar olarak tanımlanmıştır.

3.10.3. Zamana Bağlı Öldürme Çalışması

Zamana bağlı öldürme yöntemi, daha önce NCCLS (1999) tarafından açıklandığı gibi, zencefil uçucu yağı ve nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının dinamik bakterisidal aktivitelerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu amaçla, bu çalışmada akne ajanları için temsili olarak kullanılan en duyarlı bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228'in 24 saatlik kültürleri, 1×10^6 CFU/mL'lik nihai konsantrasyonda ve 500 µg veya µL formülasyonlar 2 mL CAMHB içinde karıştırılmıştır. Tüpler 37°C'de 0, 2, 4, 6 veya 24 saat süreyle inkübe edilmiş, her tüpten örnekler alınmış, seri 1/10 kat seyreltmeler yapılmış ve 100 µL'lik örnekler TSA yüzeyine ekilmiştir. Koloniler 37 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra sayıldı ve ortalama koloni sayımları (log10 cfu/mL) zamana karşı grafiğe dökülerek zamana bağlı öldürme eğrileri oluşturulmuştur. Her suşun antimikrobiyal içermeyen bir kontrolü de testlere dahil edilmiştir ve alt tespit limiti 1 log10 CFU/mL'dir. Antimikrobiyal kalıntı, NCCLS kılavuzlarına göre ilk çizginin yerinde koloni büyümesinin inhibisyonu ile kontrol edilmiştir. Bakterisidal aktivite, ilk aşılamadan ≥3 log10 cfu/mL'lik bir azalma olarak tanımlanmıştır

3.11. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

3.11.1. *In vitro* Sitotoksisite

Zencefil uçucu yağı ve nanoemüljel formülasyonlarının *in vitro* sitotoksisitelerini belirlemek için, normal fibroblast NIH/3T3 hücreleri üzerinde (2,3)-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-

sülfofenil) -(2H)-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) kullanılarak bir hücre canlılığı testi yapılmıştır (118). Hücreler, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin (10000 U/mL) içeren DMEM/F12 ortamında, %5 CO2 inkübatöründe 37 °C'de kültüre edilmiştir. %80-90 oranında yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinize edilerek 96 kuyucuklu bir plakaya 1×10^4/kuyucuk oranında ekilmiştir. Daha sonra hücreler, %1, %10 ve %50 seyreltmelerde formülasyonlar ve zencefil uçucu yağı ile 24 saat inkübe edilmiştir. Numune içermeyen hücreler kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelere XTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat daha inkübe edilmiştir. Hücrelerin optik yoğunluğu (OD), bir plaka okuyucuda (LabLine Instruments, Melrose Park, IL, ABD) 450 nm'de ölçülmüştür. Hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki denklemle belirlenmiştir (116).

Hücre canlılığı (%) = $(OD_{numune}/OD_{kontrol})$ x 100

3.11.2. Çizik Testi

NIH/3T3 hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her bir kuyuya 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, hücre tek tabakası üzerinde P100 mikropipet uçları kullanılarak doğrusal çizikler oluşturulmuş ve *in vitro* yara modeli elde edilmiştir.

Çizik oluşturma işleminin ardından hücreler %1 seyreltme oranında hazırlanan nanoemüljel formülasyonları ve zencefil uçucu yağı ile muamele edilerek 30 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Herhangi bir işlem uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Hücre göçü ve yara kapanma süreci, ters mikroskop kullanılarak 0., 24. ve 30. saatlerde görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler üzerinden yara alanındaki değişimler analiz edilerek, kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır (117). Ayrıca, çizik kapanma oranları ImageJ yazılımı kullanılarak nicel olarak hesaplanmıştır.

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler, üç bağımsız tekrardan elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmış ve ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiksel karşılaştırmalar, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilerek tek yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 7.0a yazılımı (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. UÇUCU YAĞ ANALİZİ

Zencefil uçucu yağının kimyasal bileşimi, GC-MS analizi kullanılarak detaylı olarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda uçucu yağın çok sayıda uçucu bileşen içerdiği ve bu bileşenlerin farklı oranlarda dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, zencefil uçucu yağının bileşiminde yer alan ana ve minör bileşenler ile bunların relatif yüzdeleri belirlenmiş olup, sonuçlar Tablo 4.1'de sunulmuştur. Uçucu yağın bileşiminde baskın olarak bulunan bileşenlerin, formülasyonun fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktivitesi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu analiz sonuçları, çalışmada kullanılan uçucu yağın karakterizasyonunu ortaya koymakta ve sonraki formülasyon ve biyolojik etkinlik çalışmalarının değerlendirilmesine temel oluşturmaktadır.

Tablo 4.1: Zencefil uçucu yağ bileşenleri

No	Bileşen	KI	RRI	Relatif %
1	Trisiklén	1007-1015[a]	1010	0,491±0,006
2	α-Pinen	1018-1032[a]	1026	1,853±0,003
3	Kamfen	1060-1076 [a]	1067	5,282±0,001
4	α-Felandren	1160-1176[a]	1172	0,535±0,007
5	Limonen	1190-1204[a]	1193	1,956±0,005
6	β-Felandren	1202–1218[a]	1210	1,904±0,001
7	1,8-Sineol / Eukalyptol	1203-1220[a]	1218	1,713±0,002
8	β-Elemen	1585-1600[a]	1591	0,665±0,008
9	γ-Elemen	1633–1650[a]	1640	0,714±0,001
10	Neral	1668–1693[a]	1674	0,649±0,011
11	Bornol	1690-1719[a]	1695	0,612±0,004
12	Germakren D	1699–1726[a]	1707	1,625±0,005
13	α-Zingiberen	1713-1728[a]	1720	35,568±0,015
14	Valensen	1717-1740	1722	0,839±0,004
15	β-Bisabolen	1718–1741[a]	1736	8,000±0,002
16	α-Farnesen (E,E)-	1735-1755[a]	1743	9,834±0,007
17	Geranil asetat	1743-1764[a]	1748	1,047±0,003

Tablo 4.1: (devamı)

18	β-Seskipellandren	1766-1783[a]	1769	11,990±0,002
19	Ar-Kurkumen	1766-1786[a]	1772	8,007±0,008
20	Geraniol	1830-1857[a]	1846	0,680±0,006
21	Nerolidol (Z)-	1995–2017[a]	1999	1,214±0,008
22	Elemol	2072–2096[a]	2083	0,878±0,001
23	Seskisabinen hidrat, cis-	2075–2088[a]	2085	1,106±0,004
24	Seskisabinen hidrat, trans-	1980–2092[a]	2090	0,561±0,002
25	Viridiflorol	2083-2104[a]	2090	0,824±0,006
26	β-Eudesmol	2222-2256[a]	2241	0,286±0,002
	Toplam tanımlanan			98,833
	Monoterpen hidrokarbonlar (1-6)			12,021
	Oksijenli monoterpenler (7, 10, 11, 17, 20)			4,701
	Seskiterpen hidrokarbonlar (8, 9, 12-16, 18, 19)			77,242
				4,869

RRI: n-alkanlara göre hesaplanan göreceli tutunma indeksleri % FID verilerinden hesaplanmıştır.

KI (Kovats İndeksleri), çoğunlukla her bir bileşik için RI veri aralıklarından elde edilen literatürden alınmıştır (118).

Zencefil uçucu yağında toplam 26 bileşik tespit edilmiştir. Uçucu yağın %98,833'ü tanımlanan bileşiklerden oluşmaktadır. Zencefil uçucu yağının kimyasal bileşenleri Tablo 4.1'de sunulmuştur. Sesquiterpen hidrokarbonlar (%77,242) zencefil uçucu yağının baskın kimyasal bileşen sınıfı olarak tespit edilmiştir. Zencefil uçucu yağının başlıca bileşikleri α-zingiberen (%35,568±0,015), β-sesquiphellandren (%11,990±0,002), α-farnesen (E,E)- (%9,834±0,007), Ar-kurkumen (%8,007±0,008) ve β-bisabolen (%8,000±0,002) olarak tespit edilmiştir.

4.2. NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI

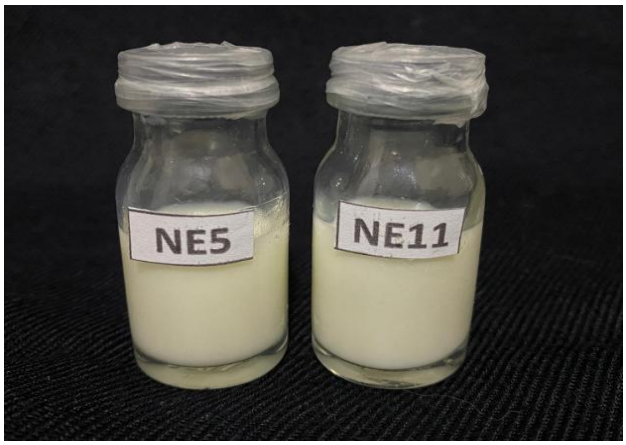
Farklı oranlarda uçucu yağ, yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde kullanılarak çeşitli nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Elde edilen formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini değerlendirmek amacıyla damlacık boyutu ve PDI analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ait sonuçlar Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucunda, düşük damlacık boyutu ve dar dağılım aralığı (düşük PDI) gösteren formülasyonların daha stabil ve homojen sistemler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda, optimum özellikler sergileyen NE5 ve NE11 kodlu nanoemülsiyon formülasyonları nanoemüljel hazırlanmasında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Seçilen nanoemülsiyon formülasyonlarının görsel özellikleri Şekil 4.1'de sunulmuş olup, sistemlerin homojen ve berrak bir görünüm sergilediği gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2: Nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutları ve PDI değerleri

Nanoemülsiyon Formülasyonları	Damlacık Boyutu	PDI
NE1	116,4 ± 3,659	0,328 ± 0,040
NE2	197± 3,477	0,242 ± 0,012
NE3	168,466 ± 1,721	0,236 ± 0,010
NE4	221,566 ± 0,650	0,299 ± 0,008
NE5	172,933 ± 1,550	0,218 ± 0,024
NE6	197,466 ± 1,401	0,263 ± 0,002
NE7	79,4 ± 0,667	0,249 ± 0,011
NE8	107,066 ± 1,401	0,237 ± 0,018
NE9	132,266 ± 3,435	0,4 ± 0,015
NE10	120,466 ± 0,896	0,319 ± 0,026
NE11	142,85 ± 2,288	0,178 ± 0,015
NE12	174,3 ± 3,567	0,281 ± 0,046



Şekil 4.1: Nanoemüljel hazırlanması için seçilen nanoemülsiyonların görünümü

4.3. NANOEMÜLSİYONLARIN KARAKTERİZASYONU

4.3.1. Makroskobik İncelemeye Ait Bulgular

Makroskobik inceleme sonucunda, formülasyonlarda faz ayrımının oluşmadığı, homojen ve süt beyazı renginde olduğu belirlenmiştir.

4.3.2. Damlacık Boyutu ve PDI

Nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutu ve PDI değerleri ölçülerek sistemlerin boyut dağılımı ve homojenliği değerlendirilmiştir. NE11 kodlu formülasyon için ortalama damlacık boyutu 145,4 ± 3,924 nm olarak belirlenmiş, PDI değeri ise 0,209 ± 0,020 olarak saptanmıştır. NE5 kodlu formülasyonda ise ortalama damlacık boyutu 186,4 ± 2,983 nm ve PDI değeri 0,1952 ± 0,023 olarak ölçülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, her iki formülasyonun da nanometrik boyut aralığında olduğunu ve düşük PDI değerleri ile dar boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir.

4.3.3. pH

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının pH değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. NE11 kodlu formülasyon için pH değeri 5,307 ± 0,012 olarak belirlenmiş, NE5 kodlu formülasyon için ise bu değer 5,863 ± 0,025 olarak saptanmıştır.

Elde edilen pH değerlerinin formülasyonlar arasında sınırlı farklılık gösterdiği ve belirli bir aralıkta dağılım sergilediği gözlenmiştir.

4.3.4. Zeta Potansiyeli

Nanoemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda, formülasyonlara ait zeta potansiyeli değerlerinin NE11 nanoemüljeli için -13,883 ± 0,222 mV ve NE5 nanoemüljeli için ise -11,901 ± 2,706 mV olduğu belirlenmiştir. Elde edilen değerler, formülasyonlar arasında sınırlı farklılıklar bulunduğunu ve yüzey yükü açısından benzer özellikler sergilediklerini göstermektedir.

4.3.5. İletkenlik

Nanoemülsiyon formülasyonlarının iletkenlik değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. NE11 kodlu formülasyon için iletkenlik değeri 0,015 ± 0,001 olarak belirlenirken, NE5 kodlu formülasyon için bu değer 0,011 ± 0,007 olarak saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar, formülasyonların iletkenlik değerlerinin birbirine yakın aralıkta olduğunu ve benzer elektriksel özellikler sergilediğini göstermektedir.

4.4. NANOEMÜLSİYONLARIN STABİLİTE ÇALIŞMASI

Bu çalışmada, zencefil uçucu yağı içeren ve optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen iki nanoemülsiyon formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar, farklı depolama koşullarının etkisini değerlendirmek amacıyla +5 °C ve +25 °C'de saklanmış ve belirli zaman aralıklarında analiz edilmiştir.

Formülasyonların fizikokimyasal özellikleri damlacık boyutu, PDI, pH, zeta potansiyeli ve iletkenlik parametreleri açısından incelenmiştir. Depolama stabilitesi, formülasyonların 0., 1., 2. ve 4. haftalarda gerçekleştirilen ölçümler sonucu elde edilen veriler doğrultusunda değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3: Nanoemülsiyonların stabilite çalışması

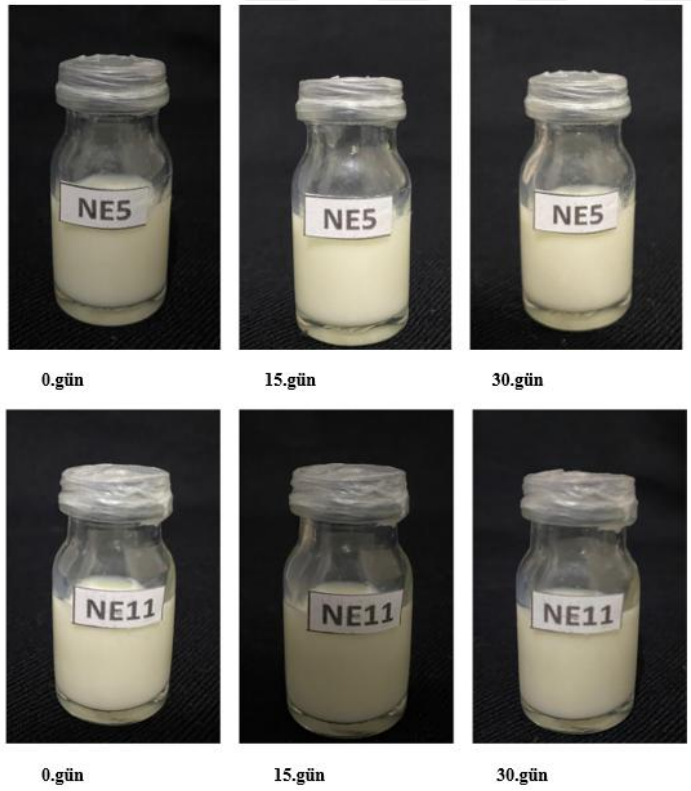
Formül	Zaman (hafta)	Damlacık Boyutu	PDI	pH	Zeta potansiyel (mV)	mS/cm
NE11 (+5 °C)	0	145,4 ± 3,924	0,209 ± 0,02081	5,307 ± 0,0115	-12,266 ± 0,265	0,015 ± 0,001
	1	159,2 ± 2,363	0,2091± 0,00756	5,297 ± 0,0379	-12,066 ± 0,404	0,017 ± 0,005
	2	160,4 ± 3,105	0,2206 ± 0,02913	5,427 ± 0,0306	-11,3 ± 0,556	0,02 ± 0,006
	4	170,93 ± 0,75	0,2574 ± 0,00418	5,297 ± 0,0379	-11,833 ± 0,115	0,02 ±0,005
NE5 (+5 °C)	0	186,4 ± 2,983	0,1952 ± 0,02304	5,863 ± 0,0252	-13,686 ± 0,402	0,015± 0,007
	1	173,9 ± 1,86	0,1724 ± 0,0145	5,997 ± 0,0306	-13,166 ± 0,208	0,011± 0,006

Tablo 4.3: (devamı)

	2	180,4 ± 1,207	0,1687 ± 0,01197	6,01 ± 0,0400	-12,033 ± 0,550	0,008 ± 0,002
	4	185± 2,2912	0,1936 ± 0,01632	5,996 ± 0,0306	-13,033 ± 0,611	0,015 ± 0,009
NE11 (+25 °C)	0	145,4 ± 3,924	0,209 ± 0,02081	5,306 ± 0,0115	-13,883 ± 0,222	0,013± 0,004
	1	158,5 ± 1,892	0,191 ± 0,01875	5,21 ± 0,0100	-15,233 ± 1,193	0,017±0,008
	2	148,7 ± 0,528	0,1898 ± 0,0058	5,223 ± 0,0208	-17,766 ± 0,472	0,008
	4	147,83 ± 2,75	0,1940 ± 0,0209	5,21 ± 0,0100	-14,033 ± 0,814	0,011± 0,004
NE5 (+25 °C)	0	186,4 ± 2,983	0,1952 ± 0,02304	5,863 ± 0,0252	-11,901 ± 2,706	0,017±0,006
	1	188,2 ± 2,013	0,1546 ± 0,01966	5,827 ± 0,0153	-12,3 ± 0,7	0,007
	2	186 ± 0,4567	0,1617 ± 0,0184	5,717 ± 0,0153	-10,866 ± 0,057	0,011 ± 0,004
	4	289,53 ± 5,39	0,3504 ± 0,03045	5,826 ±0,0153	-11,133 ± 0,25	0,01

4.4.1. Makroskobik İncelemeye Ait Bulgular

25 °C oda sıcaklığında bekletilen nanoemülsiyonların 0. 15. ve 30. günlerdeki görünümleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2: Nanoemülsiyonların 0., 15. ve 30. günlerdeki görünümleri

Tablo 4.4: Stabilite testleri için hazırlanan formülasyonların makroskobik incelemesi

Nanoemülsiyon	0. Gün Özellikleri	15. Gün Özellikleri	30. Gün Özellikleri
NE5	Faz ayrımı yoktur. Homojen ve süt beyazı görünümündedir.	Görünümü değişmemiştir, faz ayrımı da gerçekleşmemiştir.	Görünümü değişmemiştir, homojen görünümü devam etmektedir.
NE11	Faz ayrımı yoktur. Homojen ve süt beyazı görünümündedir.	Homojen gözükmektedir. Görünüm değişmemiştir.	Homojen gözükmektedir. Görünüm değişmemiştir.

4.4.2. Damlacık Boyutu ve PDI

Nanoemülsiyon sistemlerinde küçük damlacık boyutları, yüzey alanının artmasına bağlı olarak aktif bileşenlerin çözünürlüğünü artırmakta ve özellikle suda az çözünen bileşiklerin biyoyararlanımını iyileştirmektedir. Bu nedenle, nanoemülsiyonlarda genellikle 20-200 nm aralığında damlacık boyutları tercih edilmektedir (119).

PDI ise formülasyonun partikül boyut dağılımının genişliği hakkında bilgi vermekte olup, PDI değerinin 0,25'in altında olması sistemin dar ve homojen bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen nanoemülsiyon formülasyonlarının farklı depolama koşulları altında elde edilen damlacık boyutu ve PDI değerleri Tablo 4.3'te sunulmuştur.

4.4.3. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli, koloidal sistemlerde partiküller arasındaki elektrostatik etkileşimleri yansıtan ve dispersiyon stabilitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir. Genel olarak, +30 mV'nin üzerindeki ve -30 mV'nin altındaki zeta potansiyeli değerleri, sistemlerin elektrostatik açıdan stabil olduğunu göstermektedir (120).

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen nanoemülsiyon formülasyonlarının farklı depolama koşulları altında elde edilen zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.3'te sunulmuştur.

4.4.4. İletkenlik Özellikleri

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen ölçümlerde, nanoemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyeli değerlerinin -17,766 mV ile -10,866 mV arasında değiştiği belirlenmiştir. Elde edilen bu değerler, formülasyonların düşük yüzey yüküne sahip olduğunu göstermektedir.

Formülasyonda kullanılan Tween 80'in iyonik olmayan bir yüzey aktif madde olması nedeniyle sistemde belirgin bir yüzey yükü oluşmamaktadır. Bu durum, zeta potansiyeli değerlerinin düşük aralıkta gözlenmesi ile uyumludur. Bununla birlikte, literatürde Tween 80 konsantrasyonunun artmasının iyon hareketliliğini sınırlayarak elektriksel iletkenlikte azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (121). Bu bulgu, çalışmada elde edilen düşük iletkenlik ve zeta potansiyeli değerleri ile paralellik göstermektedir.

Zeta potansiyeli değerlerinin mutlak olarak yüksek olmamasına rağmen, nanoemülsiyon sistemlerinin stabilitesinin yalnızca elektrostatik etkileşimlerle değil, aynı zamanda sterik stabilizasyon mekanizmaları ile de sağlanabileceği bilinmektedir. Bu doğrultuda, formülasyonların stabilitesi damlacık boyutu, PDI ve makroskobik gözlemler gibi ek parametreler kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.4.5. pH

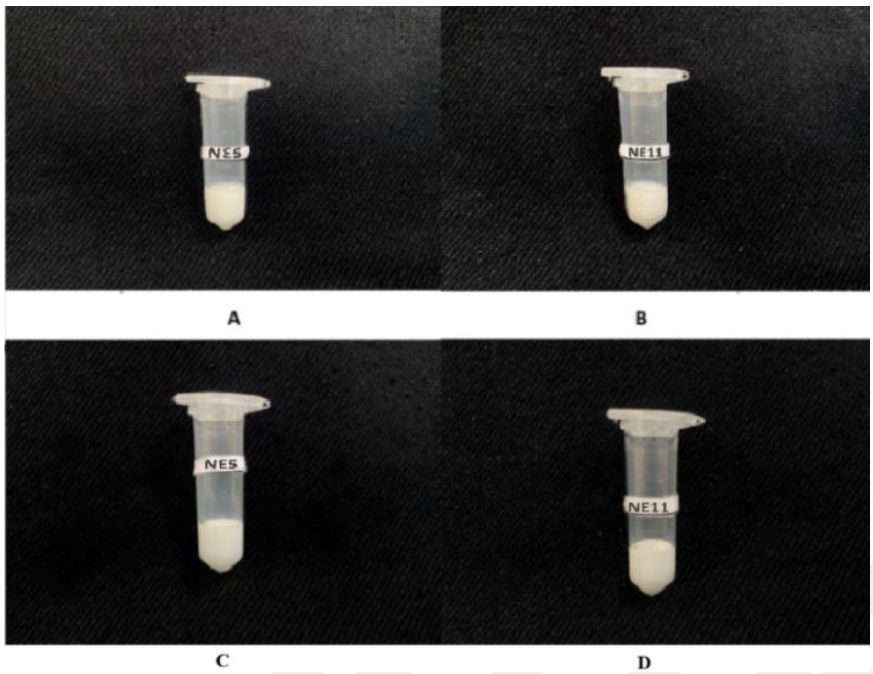
Sağlıklı bireylerde deri pH'ının genellikle 4-7 aralığında olduğu bildirilmektedir (122). Bu çalışma kapsamında incelenen nanoemülsiyon formülasyonlarının pH değerlerinin 5,2-5,8 arasında değiştiği ve deri pH aralığına yakın olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen nanoemülsiyon formülasyonlarının farklı depolama koşulları altında elde edilen pH değerleri Tablo 4.3'te sunulmuştur.

4.4.6. Santrifüj Testi

Sıcaklık artışı ve santrifüj kuvveti, emülsiyon sistemlerinin stabilitesini zorlayan önemli faktörler arasında yer almaktadır (123). Bu çalışmada uygulanan santrifüj testi sonucunda, NE5 ve NE11 kodlu nanoemülsiyon formülasyonlarının santrifüj işlemi sonrasında herhangi bir faz ayrımı, kremalaşma veya çökelme göstermediği gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgular, her iki formülasyonun da uygulanan mekanik stres koşulları altında fiziksel stabilitesini koruduğunu ortaya koymaktadır.



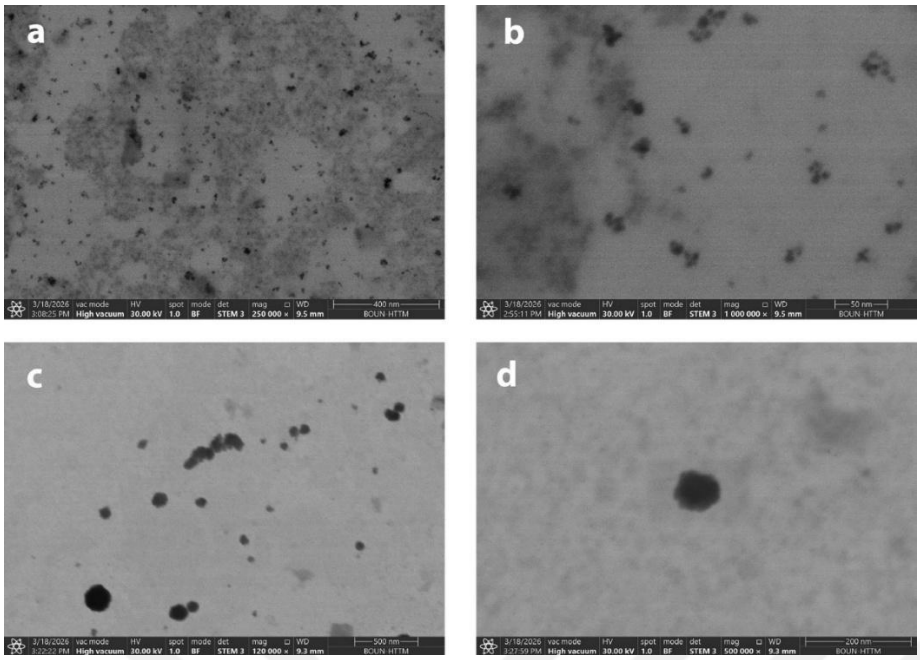
Şekil 4.3: Santrifüj testi öncesi ve sonrası nanoemülsiyonların görünüşü (A. Santrifüj öncesi NE5 nanoemülsiyonu; B. Santrifüj öncesi NE11 nanoemülsiyonu; C. Santrifüj sonrası NE5 nanoemülsiyonu; D. Santrifüj sonrası NE11 nanoemülsiyonu)

4.4.7. Termal Stabilite Testi

Uygulanan termal stabilite testi sonucunda, sıcaklık artışına bağlı olarak nanoemülsiyon formülasyonlarında herhangi bir faz ayrımı, çökelme, bulanıklık veya renk değişikliği gözlemlenmemiştir. Bu bulgular, formülasyonların değişen sıcaklık koşulları altında fiziksel stabilitelerini koruduklarını göstermektedir.

4.5. MORFOLOJİK ANALİZ

STEM analizi ile yapılan morfolojik analiz kapsamında elde edilen görüntüler Şekil 4.4'te verilmiştir. Elde edilen görüntülerde nanoemülsiyonlara ait yuvarlak damlacık yapıları belirgin bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.4: STEM görüntüleri (a.ve b. NE5 nanoemülsiyonunun görüntüleri; c. ve d. NE11 nanoemülsiyonunun görüntüleri)

4.6. NANOEMÜLJELLERİN KARAKTERİZASYONU

Hazırlanan nanoemüljellere ait görüntüler Şekil 4.5'te verilmiştir. Bu formülasyonların karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5: Geliştirilen nanoemüljel formülasyonlarının görünüşleri

4.6.1. pH

Hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının pH değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, NEG1 kodlu nanoemüljelin pH değeri 6,31 ± 0,010 NEG2 kodlu nanoemüljelin pH değeri 6,37 ± 0,023 NEG3 kodlu nanoemüljelin pH değeri 5,33 ± 0,020 ve NEG4 kodlu nanoemüljelin pH değeri 5,316 ± 0,016 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen pH değerlerinin formülasyonlar arasında belirli bir aralıkta dağılım gösterdiği gözlenmiştir.

4.6.2. İletkenlik

Nanoemüljel formülasyonlarının iletkenlik değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, NEG1 kodlu formülasyonun iletkenlik değeri 0,428 ± 0,003 mS/cm, NEG2'nin 0,43 ± 0,001 mS/cm, NEG3'ün 0,421 ± 0,005 mS/cm ve NEG4'ün 0,497 ± 0,013 mS/cm olarak belirlenmiştir.

Elde edilen iletkenlik değerlerinin formülasyonlar arasında benzer aralıkta dağılım gösterdiği gözlenmiştir.

4.6.3. Reolojik Analiz

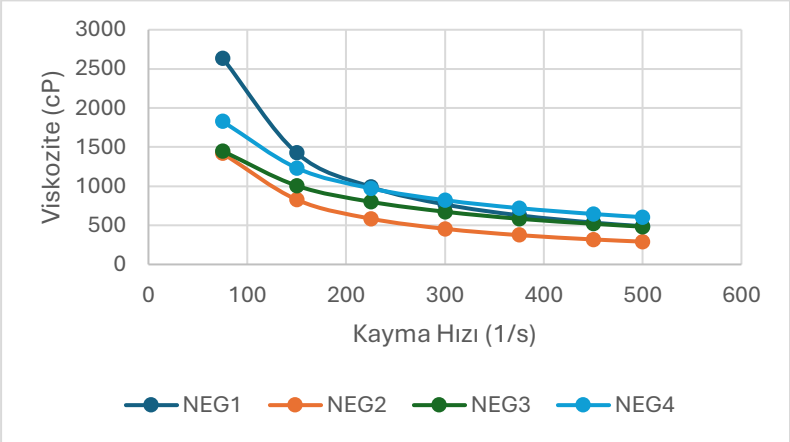
Hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının reolojik özellikleri, 37,5-250 rpm aralığında artan hız profiline göre incelenmiş ve elde edilen viskozite değerleri Tablo 4.5'te sunulmuştur. Tüm formülasyonlarda kayma hızının artmasıyla birlikte viskozite değerlerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Tablo 4.5: Nanoemüljellerin hız ve kayma hızı arttıkça oluşan viskozite değerleri

Hız RPM	Kayma Hızı 1/s	Viskozite Cp NEG1	Viskozite Cp NEG2	Viskozite Cp NEG3	Viskozite Cp NEG4
37,5	75	2637,925	1420,83	1449,935	1828,295
75	150	1424,8	828,155	1006,75	1232,975
112,5	225	991,32	585,615	800,815	972,8
150	300	767,305	455,75	674,035	821,54
187,5	375	628,125	374,655	583,68	719,68
225	450	534,905	319,71	519,91	645,15
250	500	488,955	291,71	482,605	604,845

NEG1 kodlu formülasyonun viskozite değerlerinin 2637,925 cP'den 488,955 cP'ye düştüğü, NEG2 formülasyonunda bu değerlerin 1420,83 cP ile 291,71 cP arasında değiştiği belirlenmiştir. NEG3 formülasyonunda viskozitenin 1449,935 cP'den 482,605 cP'ye azaldığı, NEG4 formülasyonunda ise 1828,295 cP ile 604,845 cP aralığında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen bu bulgular, tüm nanoemüljel formülasyonlarının kayma hızına bağlı olarak viskozite değerlerinde azalma gösterdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.6). Bu durum, formülasyonların psödoplastik (shear-thinning) akış davranışı sergilediğini göstermektedir.



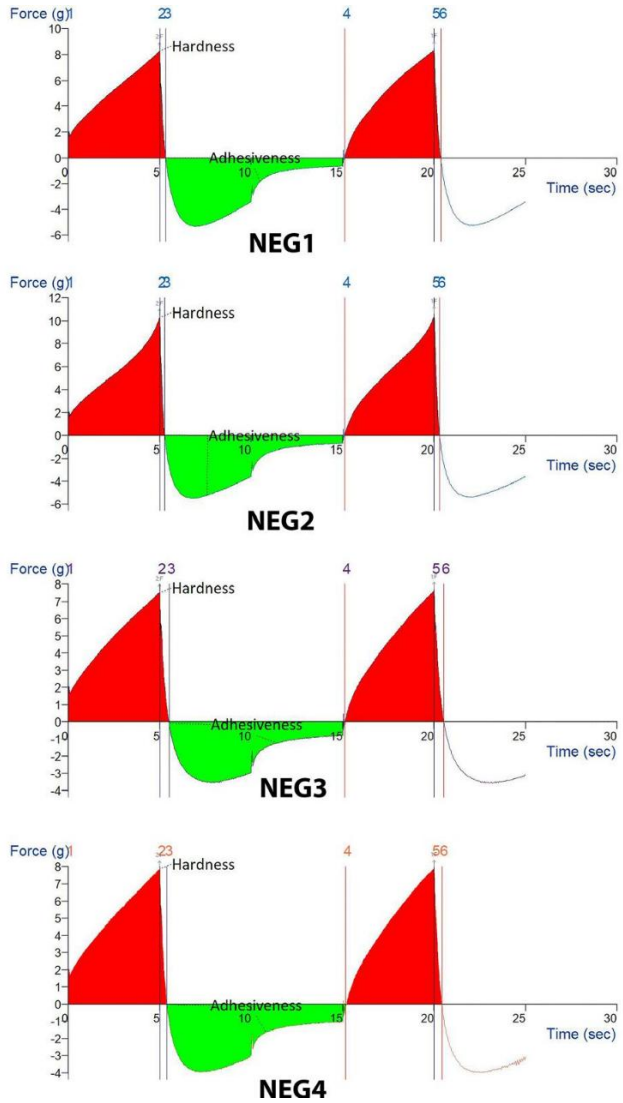
Şekil 4.6: Nanoemüljel formülasyonlarının kayma hızına bağlı viskozite değişim grafikleri

4.6.4. Tekstür Profil Analizi

Tekstür Profili Analizi (TPA) yöntemi kullanılarak hazırlanan nanaoemüljellerin dokusal özellikleri değerlendirilmiştir. Şekil 4.7'de veriler gösterilmiştir. Nanoemüljel formülasyonlarına (NEG1, NEG2, NEG3 ve NEG4) ait tekstür profil analizi sonuçları incelenmiştir (Şekil 4.7). Elde edilen kuvvet-zaman eğrilerinde tüm örneklerde iki aşamalı sıkıştırma davranışı gözlenmiştir. Eğrilerin pozitif yönlü pikleri sertlik değerlerini, negatif yönlü alanları ise yapışkanlık parametresini göstermektedir. Elde edilen sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: Nanoemüljellerin tekstür profil analiz sonuçları

Nanoemüljel	Sertlik (g)	Sıkıştırılabilirlik (g)
NEG1	8,53 ± 0,26	212,07 ± 0,116
NEG2	10,57 ± 1,52	210,347 ± 2,619
NEG3	7,62 ± 0,07	143,08 ± 6,403
NEG4	7,98 ± 0,21	154,8 ± 3,298



Şekil 4.7: Tekstür profil analizi sonuçları

Formülasyonlar arasında sertlik değerlerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. NEG1 örneği en düşük maksimum kuvvet değerine sahip olup, bunu sırasıyla NEG2, NEG3 ve NEG4 örnekleri takip etmiştir. En yüksek sertlik değeri NEG4 formülasyonunda gözlenmiştir.

Yapışkanlık değerleri incelendiğinde, negatif alanın büyüklüğünün formülasyonlara göre değiştiği görülmüştür. NEG1 ve NEG2 örneklerinde yapışkanlık alanının daha geniş olduğu, buna karşın NEG3 ve özellikle NEG4 örneklerinde bu alanın daha dar olduğu belirlenmiştir.

İkinci sıkıştırma döngüsünde elde edilen pik değerlerinin ilk döngüye benzer eğilim gösterdiği ve tüm formülasyonlarda yapısal bütünlüğün korunduğu gözlenmiştir.

4.6.5. Yayılabilirlik

Nanoemüljel formülasyonlarına ait yayılabilirlik değerleri incelenmiştir. NEG1 formülasyonunun yayılabilirlik değeri 212,07 ± 0,116 g olarak belirlenirken, NEG2 formülasyonunun 210,347 ± 2,619 g olduğu tespit edilmiştir. NEG3 ve NEG4 formülasyonlarının yayılabilirlik değerleri ise sırasıyla 143,038 ± 6,403 g ve 154,8 ± 3,298 g olarak bulunmuştur.

Elde edilen veriler doğrultusunda, NEG1 ve NEG2 formülasyonlarının birbirine yakın ve daha yüksek yayılabilirlik değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Buna karşılık NEG3 ve NEG4 formülasyonlarında yayılabilirlik değerlerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

4.6.6. *Ex vivo* Biyoadezyon

Ex vivo domuz derisine biyoadezyon çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. *Ex vivo* biyoadezyon çalışması sonuçlarına göre, nanoemüljel formülasyonlarının adezyon özellikleri arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Maksimum adezyon kuvveti ve adezyon işi değerleri incelendiğinde, NEG1 kodlu formülasyonun en yüksek adezyon kuvvetine (0,09 ± 0,01 N) ve adezyon işi değerine (0,34 ± 0,02 N·s) sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer formülasyonların (NEG2, NEG3 ve NEG4) ise benzer adezyon kuvveti ve adezyon işi değerleri gösterdiği görülmüştür. NEG1 formülasyonunun diğer formülasyonlara kıyasla deride daha uzun süre kalması sayesinde topikal uygulamalarda etkinliğinin daha yüksek olması beklenmektedir.

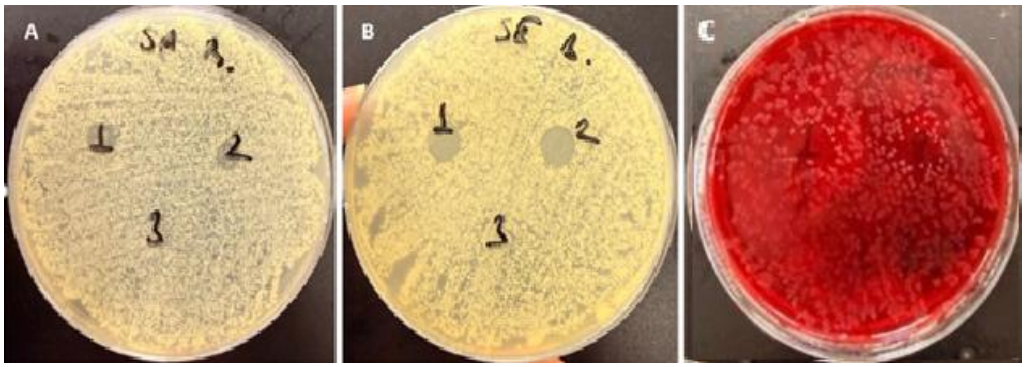
Tablo 4.7: Nanoemüljellerin *ex vivo* biyoadezyon sonuçları

Nanoemüljel	Maksimum adezyon kuvveti (N)	Adezyon işi (N·s)
NEG1	0,09 ± 0,01	0,34 ± 0,02
NEG2	0,07 ± 0,001	0,21 ± 0,02
NEG3	0,07 ± 0,001	0,21 ± 0,01
NEG4	0,07 ± 0,001	0,22 ± 0,01

4.7. *IN VITRO* ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

4.7.1. Agar Difüzyon Testi

Formülasyonların antimikrobiyal etkileri agar difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen inhibisyon zonları görsel olarak incelenmiş olup, görsel sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiştir. Ayrıca inhibisyon zonları Tablo 4.8'de verilmiştir. *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) ve *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) üzerinde belirgin inhibisyon bölgelerinin oluştuğu görülmüştür. *C. acnes* (ATCC 11828) üzerinde elde edilen görüntülerde ise inhibisyon etkisinin daha sınırlı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.8: Agar difüzyon testi çalışması: 1) NE11, 2) NE5 ve 3) %4 zencefil uçucu yağı A*) S. aureus* ATCC 29213, B) *S. epidermidis* ATCC 12228, C*) C. acnes* ATCC 11828'e karşı inhibisyon bölgelerini temsil eden görüntü örnekleri.

Tablo 4.8: Agar difüzyon testi inhibisyon bölgesi çapları (mm)

	S. epidermidis* ATCC *12228	***P. acnes* ATCC 11828**	***S. aureus* ATCC 29213**	***C. albicans* ATCC 10231**
NE5	14 mm	14 mm	7 mm	-
NE11	13 mm	12 mm	9 mm	-
NEG1	4 mm	12 mm	1 mm	-
NEG2	3 mm	10 mm	-	-
NEG3	7 mm	16 mm	1 mm	-
NEG4	7 mm	15 mm	-	-
%1,5 hyalüronik asit jeli	-	-	-	-
%0,5 carbopol jeli	-	-	-	-
Zencefil uçucu yağı	-	5 mm	-	-

S. epidermidis (ATCC 12228) üzerinde en yüksek inhibisyon zonu NE5 formülasyonunda (14 mm) gözlenmiş olup, bunu NE11 (13 mm), NEG3 ve NEG4 (7 mm) formülasyonları takip etmiştir. NEG1 ve NEG2 formülasyonlarında ise sırasıyla 4 mm ve 3 mm inhibisyon zonları ölçülmüştür. E1 ve E2 kontrol jellerinde herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir.

P. acnes (ATCC 11828) üzerinde en yüksek inhibisyon zonu NEG3 formülasyonunda (16 mm) belirlenmiştir. NEG4 (15 mm), NE5 (14 mm), NEG1 ve NE11 (12 mm) ile NEG2 (10 mm) formülasyonları bunu takip etmiştir. Zencefil uçucu yağı örneğinde ise 5 mm'lik inhibisyon zonu ölçülmüştür. E1 ve E2 formülasyonlarında inhibisyon gözlenmemiştir.

S. aureus (ATCC 29213) üzerinde en yüksek inhibisyon zonu NE11 formülasyonunda (9 mm) elde edilmiştir. NE5 formülasyonunda 7 mm inhibisyon zonu gözlenirken, NEG1 ve NEG3 formülasyonlarında 1 mm'lik oldukça düşük inhibisyon belirlenmiştir. NEG2, NEG4, E1 ve E2 formülasyonlarında inhibisyon gözlenmemiştir.

C. albicans (ATCC 10231) üzerinde ise hiçbir formülasyonda inhibisyon zonu oluşmamıştır.

4.7.2. Mikrodilüsyon Çalışması

Nanoemülsiyon formülasyonlarının ve %4 zencefil uçucu yağının MIC ve MBC değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Nanoemülsiyon formülasyonlarının ve %4 zencefil uçucu yağının minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri incelendiğinde, formülasyonların mikroorganizmalara karşı farklı düzeylerde

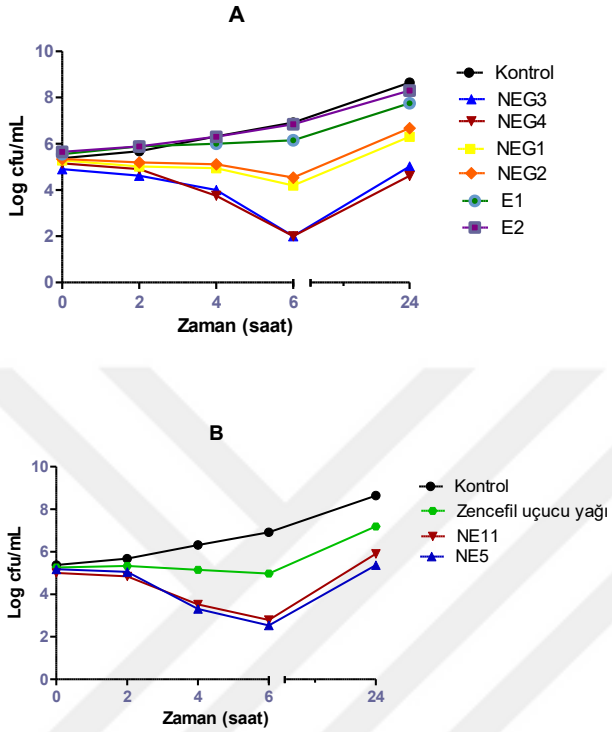
antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. NE11 formülasyonunun *S. epidermidis* ATCC 12228 suşuna karşı MİK değerinin 1/8, MBK değerinin ise 1/4 olduğu; *P. acnes* ATCC 11828 suşuna karşı ise hem MİK hem de MBK değerlerinin 1/4 olduğu tespit edilmiştir. NE5 formülasyonunun ise *S. epidermidis* ATCC 12228 suşuna karşı daha düşük MİK ve MBK değerleri (1/16) gösterdiği, *P. acnes* ATCC 11828 suşuna karşı MİK değerinin 1/16 ve MBK değerinin 1/8 olduğu belirlenmiştir. %4 zencefil uçucu yağının yalnızca *P. acnes* ATCC 11828 suşuna karşı MİK değerinin 1/2 olduğu saptanmıştır. *S. aureus* ATCC 29213 ve *C. albicans* ATCC 10231 suşlarına karşı ise herhangi bir antimikrobiyal etkinlik gözlenmemiştir.

Tablo 4.9: Nanoemülsiyonların ve zencefil uçucu yağının (seyreltme oranları) MIC ve MBC değerleri

	***S. epidermidis* ATCC 12228**		***P. acnes ATCC 11828***		***S. aureus* ATCC 29213**		***C. albicans* ATCC 10231**	
Formülasyon	**MİK**	**MBK**	**MİK**	**MBK**	**MİK**	**MBK**	**MİK**	**MBK**
NE11	1/8	1/4	1/4	1/4	-	-	-	-
NE5	1/16	1/16	1/16	1/8	-	-	-	-
%4 zencefil uçucu yağı	-	-	1/2	-	-	-	-	-

4.7.3. Zamana Bağlı Öldürme Çalışması

Zamana bağlı öldürme eğrisi çalışmasının sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir.

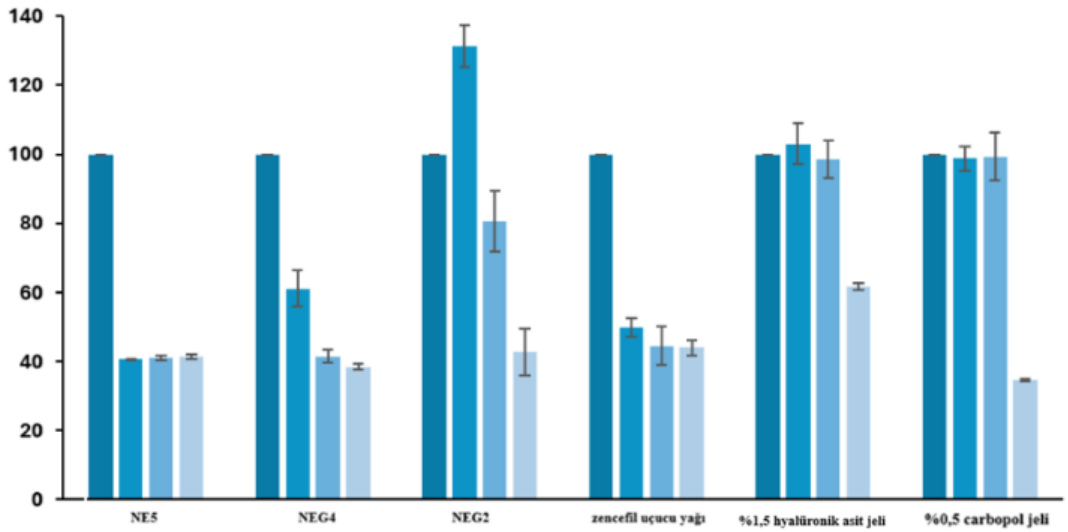


Şekil 4.9: Zamana bağlı öldürme eğrisi sonuçları: A) Nanoemüljel ve boş jel formülasyonları ve B) Nanoemülsiyon formülasyonlarının ve zencefil uçucu yağının S. epidermidis ATCC 12228'e karşı 24 saatlik öldürme eğrisi grafikleri (X ekseni zamanı (saat olarak), Y ekseni hayatta kalan bakteri sayısını, kontrol: herhangi bir madde ile işlem görmemiş bakteri sayısını temsil eder)

4.8. *IN VITRO* HÜCRE ÇALIŞMALARI

4.8.1. *In Vitro* Sitotoksisite Testi

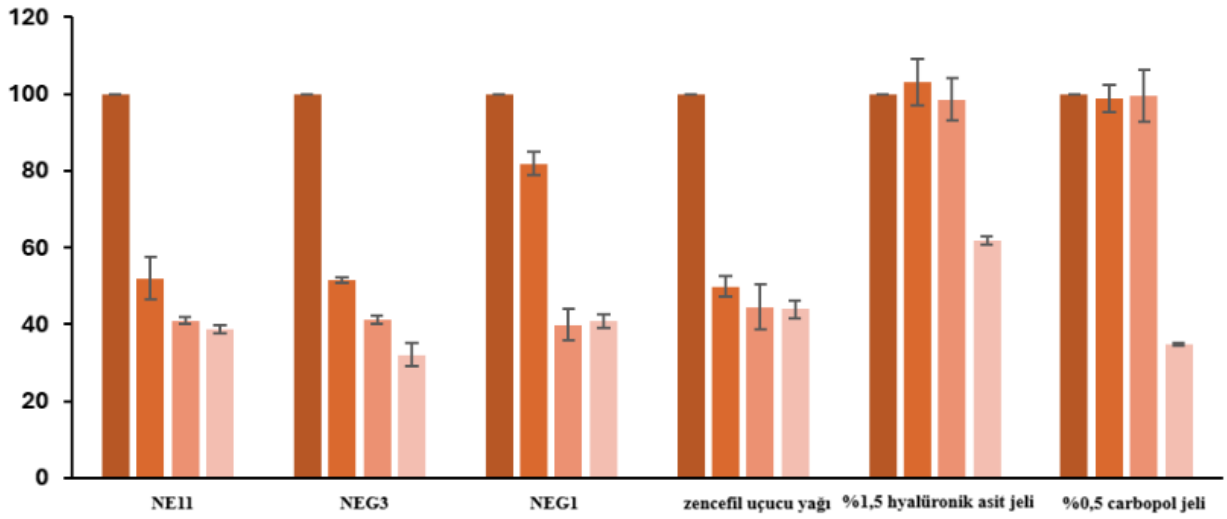
Bu çalışmada, hücre canlılığını değerlendirmek için MTT testleri yapılmıştır. NE5, NEG2 ve NEG4 formülasyonlarına ait sonuçlar Şekil 4.10'da ve Tablo 4.10'da verilmiştir. NE11, NEG1 ve NEG3 formülasyonlarına ait sonuçlar ise Şekil 4.11'de ve Tablo 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.10: NE5, NEG2 ve NEG4 formülasyonlarının karşılaştırmalı *in vitro* sitotoksisite testi sonuçları (soldan sağa doğru barlar: kontrol, %1, %10 ve %50 seyreltme oranlarını ifade etmektedir)

Tablo 4.10: NE5, NEG2 ve NEG4 formülasyonlarının hücre canlılığı sonuçlarının ortalama ± standart sapma (SS) değerleri (%)

Konsantrasyon	**NE5**	**NEG4**	**NEG2**	**Zencefil uçucu yağı**	**%1,5 Hyalüronik asit jeli**	**%0,5 Carbopol jeli**
Kontrol	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
1%	40,78 ± 0,10	61,14 ± 5,11	131,29 ± 5,99	49,82 ± 2,60	103,07 ± 6,04	98,80 ± 3,52
10%	41,13 ± 0,71	41,49 ± 1,84	80,70 ± 8,78	44,57 ± 5,69	98,59 ± 5,39	99,35 ± 6,78
50%	41,49 ± 0,63	38,51 ± 0,72	42,74 ± 6,74	43,96 ± 2,31	61,77 ± 1,00	34,69 ± 0,31



Şekil 4.11: NE11, NEG1 ve NEG3 formülasyonlarının karşılaştırmalı *in vitro* sitotoksisite testi sonuçları (soldan sağa doğru barlar: kontrol, %1, %10 ve %50 seyreltme oranlarını ifade etmektedir)

Tablo 4.11: NE11, NEG1 ve NEG3 formülasyonlarının hücre canlılığı sonuçlarının ortalama ± standart sapma (SS) değerleri (%)

Konsantrasyon	NE11	NEG3	NEG1	Zencefil uçucu yağı	%1,5 hyalüronik asit jeli	%0,5 carbopol jeli
Kontrol	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
1%	51,88 ± 5,51	51,46 ± 0,76	81,82 ± 2,91	49,82 ± 2,60	103,07 ± 6,04	98,80 ± 3,52
10%	40,94 ± 0,95	41,23 ± 0,96	39,85 ± 4,15	44,57 ± 5,69	98,59 ± 5,39	99,35 ± 6,78
50%	38,67 ± 1,06	32,09 ± 3,13	40,91 ± 1,70	43,96 ± 2,31	61,77 ± 1,00	34,69 ± 0,31

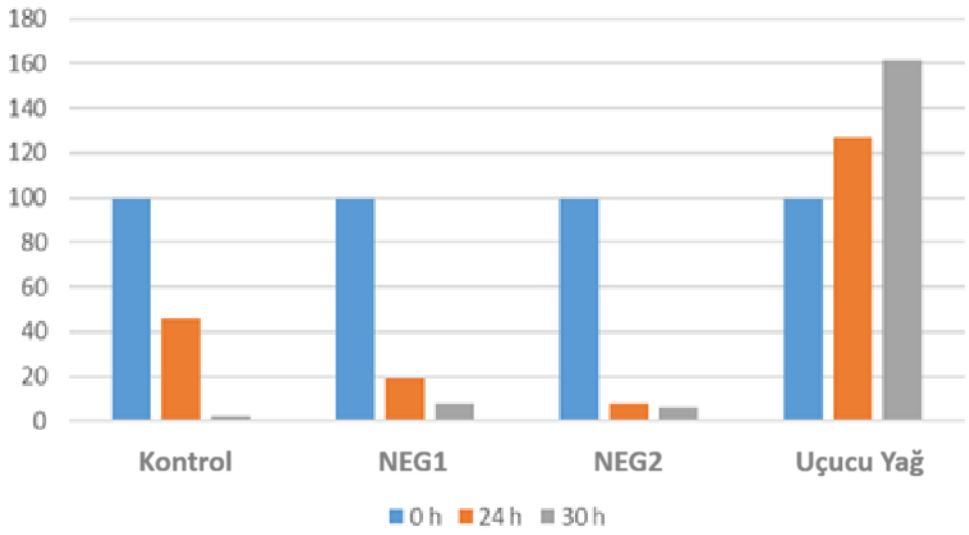
In vitro sitotoksisite testi sonuçları incelendiğinde, tüm formülasyonların hücre canlılığı üzerinde konsantrasyona bağlı etkiler gösterdiği belirlenmiştir. NE5, NEG4 ve NEG2 formülasyonlarına ait veriler değerlendirildiğinde, özellikle %1 seyreltmede NEG2 formülasyonunun hücre canlılığını %100'ün üzerine çıkardığı ve hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür. Artan konsantrasyonlarda ise tüm formülasyonlarda hücre

canlılığında azalma eğilimi gözlenmiştir. Benzer şekilde, NE11, NEG3 ve NEG1 formülasyonlarında da konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının azaldığı, ancak bu azalmanın formülasyona bağlı olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Zencefil uçucu yağının tek başına uygulandığında orta düzeyde sitotoksik etki gösterdiği, buna karşın boş jel formülasyonlarının (%1,5 hyalüronik asit jeli ve %0,5 Carbopol jeli) genel olarak yüksek hücre canlılığı değerleri sergileyerek biyouyumlu bir profil ortaya koyduğu belirlenmiştir.

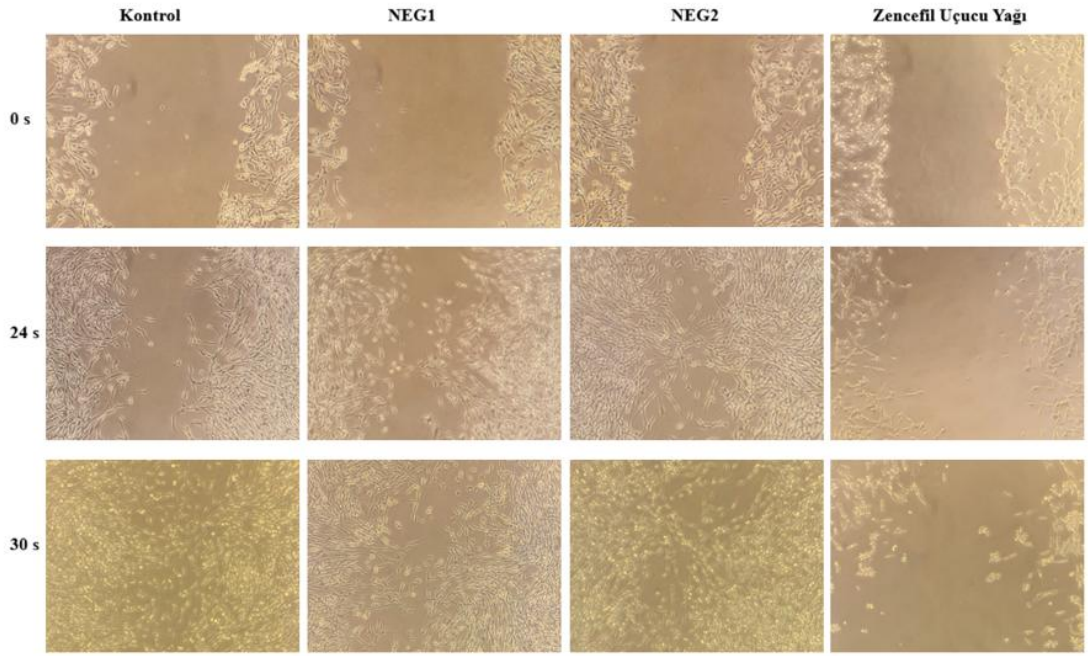
%1 konsantrasyonda elde edilen hücre canlılığı değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Özellikle NEG2 formülasyonunun diğer tüm gruplara kıyasla daha yüksek hücre canlılığı gösterdiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. NE5 formülasyonu en düşük hücre canlılığı değerini gösterirken, zencefil uçucu yağı ve diğer nanoemüljel formülasyonlarının orta düzeyde hücre canlılığı sergilediği görülmüştür. Boş jel formülasyonları (%1,5 hyalüronik asit jeli ve %0,5 Carbopol jeli) yüksek hücre canlılığı değerleri ile biyouyumlu bir profil ortaya koymuş ve bazı formülasyonlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek değerler göstermiştir ($p<0,05$).

4.8.2. Çizik Testi

Yapılan *in vitro* sitotoksisite ve *in vitro* antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre NEG1 ve NEG2 formülasyonlarına çizik testi uygulanmış ve bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.12: *In vitro* çizik testi sonuçlarına göre % yara kapanma oranları



Şekil 4.13: Çizik testinde oluşturulan hücre boşluğunun 0, 24 ve 30. saatlerdeki görüntüleri

5. TARTIŞMA

Deri hastalıkları dünya genelinde yaklaşık olarak 1,9 milyar insanı etkileyen önemli hastalılardandır (124). Deri hastalıkları, kaşıntı, batma, acı ve yanma gibi rahatsız edici rahatsız edici durumlara sebep olabilirler (125). Bu durumlar kişinin yaşam kalitesini etkileyebilmektedir. Ayrıca görünüş olarak da kötü görüntü oluşturmalarından dolayı sosyal hayatı etkileyerek psikolojik sorunlara da yol açabilmektedir (126). Egzama, mantar enfeksiyonları, psöriyazis ve viral siğiller görülen deri hastalıklarından bazılarıdır (127). Akne ise en sık gözüken deri hastalıklarından ilk üçtedir (128).

Deri hastalıklarının oluşmasına en çok bakteriler sebep olsa da mantarlar, virüsler, protozoolar da deri hastalıklarının oluşumuna sebep olabilirler (129). Bu hastalıkları tedavi etmek için topikal tedavilerden yararlanılmaktadır. Kortikosteroidler, antibiyotikler, retinoidler ve antifungal ilaçlar tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır (130). Fakat bu ilaçlar iritasyon, alerjik reaksiyonlar, deride değişiklikler, kontakt dermatit, kuruluk gibi yan etkilere sebep olabilmektedir (131). Bu sebeplerden dolayı yan etkileri daha düşük, daha az toksik ve biyoyararlanımı yüksek olan doğal alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır.

Zencefil bitkisi, 2500 yıldır Ayurveda ve Geleneksel Çin tıbbında kullanılan bir bitkidir. Zengin içeriği sayesinde mide bulantısında, hazımsızlıkta ve sindirim problemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca antiinflamatuar, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri de bulunmaktadır (132).

Zencefil uçucu yağı ise zencefil bitkisinin rizomlarından elde edilir. Yapısında zingiberen, β-bisabolen, geranial, neral gibi bileşenler bulunur. Antibakteriyel, analjezik, antifungal ve antiinflamatuar özellikleri yapılan çalışmalarda görülmüştür (133). Fakat uçucu yağların doğrudan kullanılması stabilite, yağların uçması ve toksisite gibi sorunlara yol açabilir.

Stabilitenin sağlanması, biyoyararlanımın artması, kontrollü salım ve antimikrobiyal etkinliğin kontrolü için uçucu yağlar emülsiyon sistemleriyle formülize edilebilirler (134). Emülsiyonların nano boyutlarda oluşturulmasıyla, daha küçük damlacık boyutu ve daha geniş yüzey alanına sahip olan nanoemülsiyonlar oluşturulur. Naneomülsiyonlar daha yüksek biyoyararlanıma, daha iyi fiziksel stabiliteye, daha iyi çözünürlüğe ve daha az faz ayrımına sahiptir (135). Hazırlanan nanoemülsiyon formu jelleştirilerek nanoemüljele dönüştürülür. Bu sayede lokal bölgede kalış süresi de arttırılmış olur ve terapötik etki artar (136).

Yapılan bu tez çalışmasında, deri hastalıkları yaşayan kişiler için literatürde etkinlikleri kanıtlanmış olan zencefil uçucu yağı ile hazırlanan topikal kullanıma uygun nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonları hazırlanmış, kararlı bir formülasyon elde edebilmek için çeşitli denemeler yapılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında kullanılan kütle spektroskopisi ile belirlenen zencefil uçucu yağında toplam 26 bileşik tespit edilmiştir. Uçucu yağın %98,833'ü tanımlanan bileşiklerden oluşmaktadır. Seskiterpen hidrokarbonlar (%77,242), zencefil uçucu yağının baskın kimyasal bileşen sınıfı olarak tespit edilmiştir. Sonuçların literatürdeki önceki çalışmalarla Tutarlı olduğu gözlemlenmiştir. Literatüre göre; zingiberen, β-sesquiphellandrene, Ar-kurkumen ve α-farnesen, Z. officinale uçucu yağının ana bileşenleridir (137).

Nanoemülsiyon formülasyonu çalışması yapılırken 12 adet farklı nanoemülsiyon çalışması yapılmıştır. Farklı uçucu yağ, sürfaktan, kosürfaktan ve su yüzdeleri değerlendirilmiştir. Belirlenen oranlarda su, sürfaktan ve kosürfaktan tartılıp karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım manyetik karıştırıcıda, manyetik balık konularak 200 rpm'de 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Ayrı bir flakonda uçucu yağ tartılmıştır. Hazırlanan uçucu yağ ekli flakonun içerisine manyetik balık konulmuştur. Hazırlanan karışım pastör pipeti ile damla damla uçucu yağın üzerine eklenmiştir. Karıştırıcı hızı başlangıçta 200 rpm olarak başlatılmış, karışımdan damla damla eklendikçe 1000 rpm'de kadar yükseltilmiştir. 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. Ardından sonikatör cihazında 70 amp 10 dakika boyunca ultrasonik işlem uygulanarak nanoemülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Hazırlanan nanoemülsiyonlar, damlacık boyutu ve PDI açısından değerlendirilmiştir. En ideal formülasyonlar NE5 ve NE11 seçilmiştir.

Seçilen nanoemülsiyonlar için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutu ve PDI, bileşimin homojenliğini ekonomik olarak gösteren ve stabilitesini ve dağılımını belirleyen değerlerdir. Nanoemülsiyonlarda genellikle 20-200 nm damlacık boyutları tercih edilir (138). PDI <0,25, formülasyonun çok dar bir parçacık boyutu dağılımına sahip olduğunu ve daha kararlı olduğunu gösterir (119). Deri pH değeri pH 4-7 arasında değişmektedir (122). NE11 kodlu formülasyon için 0. günde ölçülen pH değeri 5,3066, NE5 kodlu dozaj için ölçülen pH değeri ise 5,8633 olarak bulunmuştur. Bu değerler deriye uygulamak için uygun pH aralığında olduklarını göstermektedir. İletkenlik değerleri incelendiğinde ise iyonik olmayan bir yapıya sahip olan Tween 80'in yüzey aktif madde olarak kullanılması düşük iletkenlik değerlerine neden olabilmektedir. Bu

formülasyonlarda da Tween 80 kullanılması iletkenlik değerinin düşük çıkmasına neden olmuştur.

Nanoemülsiyonlardaki küçük damlacık boyutları, temas yüzey alanını artırarak ilaçların daha iyi çözünmesini sağlar, suda az çözünen ilaçların çözünmesini artırır ve biyoyararlanımı yükseltir. Nanoemülsiyonlarda genellikle 20-200 nm damlacık boyutları tercih edilir (138). PDI değerinin 0,25'ten küçük olması formülasyonun çok dar bir parçacık boyutu dağılımına sahip olduğunu ve daha kararlı olduğunu gösterir (119).

Bu tez çalışmasında geliştirilen nanoemülsiyon formülasyonlarının fizikokimyasal stabilitesi, farklı depolama koşullarında (+5 °C ve +25 °C) zamanla meydana gelen değişimler üzerinden değerlendirilmiştir. Stabilite; damlacık boyutu, PDI, pH, zeta potansiyeli ve iletkenlik parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutu, fiziksel stabilitenin en önemli göstergelerindendir (139). Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutunun artması, stabilite kaybının göstergelerinden biridir (140).

Elde edilen veriler göre tüm formülasyonlarda depolama süresi ile birlikte damlacık boyutunda artış eğilimi gözlenmiştir. Bu artış özellikle NE5 formülasyonunda ve +25 °C depolama koşulunda belirgin olup, sistemde stabilite kaybına neden olan süreçlerin başlamış olabileceğini göstermektedir.

Bu durum, nanoemülsiyonlarda yaygın olarak görülen; ostwald olgunlaşması, koalesans, flokülasyon gibi süreçlerle açıklanabilir (141). Ostwald olgunlaşması, küçük damlacıkların çözünerek daha büyük damlacıkların oluşmasına sebep olan stabilite kaybı mekanizmasıdır (142). Sıcaklık artışı ile difüzyon hızının artması, stabilite kaybını hızlandırmaktadır (143).

NE11 formülasyonunun daha stabil davranış göstermesi, kullanılan yüzey aktif sistemin daha etkin bir ara yüzey filmi oluşturarak damlacık birleşmesini engellediği ve stabilitenin artmasını sağladığını düşündürmektedir (144).

PDI değerlerinin başlangıçta düşük olması sistemlerin homojenliğini göstermektedir. PDI değerinin 0,3'ün altında olması, nanoemülsiyonlarda dar boyut dağılımı ve iyi homojenlik göstergesi olarak kabul edilmektedir (145).

Nanoemülsiyon sistemlerinde pH, formülasyonun kimyasal stabilitesi açısından önemli bir göstergedir. pH değişimi kimyasal stabiliteyi doğrudan etkiler (146). Yapılan çalışmada pH

değerlerinin genel olarak stabil kaldığı gözlenmiştir. Bu durum, formülasyon bileşenlerinin kimyasal olarak kararlı olduğunu göstermektedir. Sıcaklık artışı ile kimyasal reaksiyon hızının artması, pH değişimlerine sebep olabilmektedir (147).

Zeta potansiyeli, fiziksel stabilitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir parametredir (148). Çoğunlukla ±30 mV üzerindeki zeta potansiyeli değerleri yüksek stabilite ile ilişkilendirilmektedir (149). Bu çalışmada elde edilen değerlerin -10 ile -17 mV arasında olması, nanoemülsiyonların orta düzey elektrostatik stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. Düşük zeta potansiyeline sahip sistemlerde stabilitenin sterik stabilizasyon ile sağlandığı bilinmektedir (150). Bu durum, kullanılan noniyonik yüzey aktif maddelerin damlacık yüzeyinde oluşturduğu sterik bariyer ile açıklanabilir.

İletkenlik ölçümleri, nanoemülsiyon sistemlerinde faz tipi ve sistem bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir (151). İletkenlik, özellikle O/W ve W/O emülsiyonların ayrımında kullanılan temel parametrelerden biridir (152). Çalışmada iletkenlik değerlerinde belirgin bir değişim gözlenmemesi, sistemde faz ayrımı oluşmadığını göstermektedir. Stabil nanoemülsiyonlarda iletkenlik değerlerinin zamanla büyük değişim göstermemesi beklenmektedir (153).

Depolama sıcaklığının nanoemülsiyon stabilitesi üzerinde önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir. +25 °C'de destabilizasyon daha belirgin gözlenmiştir. Sıcaklık artışı, Brownian hareketi ve damlacık çarpışma sıklığını artırarak destabilizasyonu hızlandırmaktadır (154). Ayrıca yüksek sıcaklık, ostwald olgunlaşmasını hızlandıran önemli bir faktördür (155). Buna karşılık düşük sıcaklıkta depolanan sistemlerin daha stabil kalması, kinetik süreçlerin yavaşlaması ile açıklanabilir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda NE11 formülasyonu daha stabil bir profil sergilemiştir. Nanoemülsiyon stabilitesinin hem formülasyon bileşimine hem de depolama koşullarına bağlı olduğu literatürde yaygın olarak bildirilmektedir (156).

NE11 formülasyonu hem damlacık boyutu hem de PDI açısından daha stabil bir profil sergilemiştir. NE5 formülasyonu, özellikle oda sıcaklığında depolama koşullarında daha düşük stabilite göstermiştir. Nanoemülsiyon stabilitesinin sıcaklığa duyarlı olduğu ve düşük sıcaklıkta depolamanın önerilebileceği sonucuna varılmıştır.

Sağlıklı bir kişinin deri pH'ı değişir, ancak genellikle 4 ile 7 arasındadır (122). Seçilen nanoemülsiyonların pH değerleri incelendiğinde, deri pH'ına yakın oldukları tespit edilmiştir.

Sıcaklığın artması ve santrifüj kuvveti kullanılarak yapılan santrifüjleme, emülsiyonun stabilitesini zorlayan faktörlerdir (123). Santrifüj testi sonucunda, hazırlanan nanoemülsiyonların (NE5 ve NE11) santrifüjlemeden sonra herhangi bir faz ayrımı, krema oluşumu veya çökelme göstermediği ve fiziksel kararlı olduğu gözlemlenmiştir.

Termal stabilite testi sonucunda, sıcaklık değişimlerine rağmen nanoemülsiyonlarda faz ayrımı, çökelme, bulanıklık veya renk değişikliği gözlemlenmemiştir.

STEM görüntüsünde küresel yoğunluk görülmüştür. Nanoemülsiyonlar 20-200 nm damlacık boyutundadırlar. Damlacıkların homojen halde dağılmış şekilde bulunduğu ve çok sıkı olmadığı görülmüştür. Bu da nanoemülsiyon yapısına uygundur.

Fotoğrafta görülen koyu renkli kısımlar yağ damlacıklarını belirtirken açık renkli kısımlar su fazını göstermektedir. Damlacıkların çok yoğun olmaması ve birbirine yapışmaması stabilitenin iyi olduğunun bir göstergesidir.

STEM görüntüleri incelendiğinde damlacık çaplarının 200 nm'den küçük olduğunu göstermektedir. Bu da Zetasizer ile DLS yöntemiyle yapılan parçacık boyutlandırma sonuçlarını desteklemektedir.

Nanoemülsiyonların kalış süresini arttırıp terapötik etkiyi arttırmak için jelleştirme yapılarak nanoemüljeller oluşturulmuştur. Seçilen nanoemülsiyonlara jelleştirme için Carbopol ve hyalüronik asit eklenmiştir. Nanoemüljellerin karakterizasyonu için pH, iletkenlik, viskozite, doku profil analizi, yayılabilirlik ve biyoadezyon özellikleri incelenmiştir.

Nanoemüljellerin karakterizasyonu için pH değerleri incelenmiştir. Deri pH değeri 4-7 arasında değişebilir (122). Elde edilen pH değerlerinin aralığı deri pH değerleri aralığında olduğundan, geliştirilen nanoemüljellerin topikal kullanımı pH açısından uygundur. Uygun pH değerinin formülasyonun stabilitesini sağladığı ve tahriş riskini azalttığı düşünülmektedir.

Nanoemüljellerde kullanılan nanoemülsiyonların iletkenlik değerleri ile nanoemüljellerin iletkenlik değerleri karşılaştırıldığında, iletkenlik değerlerinin jelleşme ile arttığı gözlemlenmiştir. Polimer kaynaklı iyonlaşmada da bir artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, nanoemülsiyonun jelleşme süresi boyunca fiziksel olarak stabil kaldığı şeklinde yorumlanabilir. Elde edilen verilere dayanarak, hazırlanan formülasyonların düşük elektrolitli, iyonik olmayan, faz ayrışması göstermeyen ve yapısal olarak stabil olduğu sonucuna varılabilir. Bu, geliştirilen nanoemülsiyonların başarılı bir şekilde nanoemüljellere dönüştürüldüğünü göstermektedir.

Hazırlanan formülasyonların viskozite sonuçları, viskozitenin artan kayma hızıyla azaldığını göstermektedir. Viskozite, biyoaktif moleküllerin geçirgenliğini ve biyoyararlanımını etkilediği için nanoemüljeller için önemli bir faktördür (97). Sonuçlar, formülasyonların kayma inceltici bir yapı sergilediğini göstermektedir. Bu özellik, topikal jellerde beklenir ve formülasyonun uygulama sırasında daha kolay yayılmasını sağlar.

Tekstür profil analizi grafiğinde ilk pozitif tepe noktalarının göründüğü noktalar, probun numuneye ilk temas ettiği anda elde edilen sertlik değerleridir. Grafiklerin incelenmesi, polimer olarak hyalüronik asit içeren NEG1 ve NEG2 kodlu formülasyonların daha yüksek sertlik değerlerine sahip olduğunu, polimer olarak Carbopol içeren NEG3 ve NEG4 kodlu formülasyonların ise hyalüronik asit içerenlere göre daha yumuşak olduğunu göstermektedir. Bu, formülasyonun deriye uygulanmasının daha kolay olduğunu gösterebilir.

Tekstür profil analizi grafiklerindeki negatif kuvvet alanları yapışkanlık değerlerini temsil eder. Grafiklerin incelenmesi, NEG1 ve NEG2 kodlu formülasyonların alanlarının daha büyük olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, hyalüronik asit içeren formülasyonların daha yapışkan olduğu görülmektedir. Genel olarak, hazırlanan formülasyonların orta düzeyde sertlik değerlerine, yeterli yapışma değerlerine sahip olduğu ve iyi elastik davranış sergilediği sonucuna varılabilir.

NEG1 formülasyonunun yayılabilirlik değeri 212,07 g, NEG2 formülasyonunun ise 210,347 g'dır. Elde edilen verilere göre, iki formülasyonun da yaklaşık olarak aynı değerleri verdiği ve iyi yayılabilirlik özelliklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

NEG3 formülasyonunun yayılabilirlik değeri 143,038 g, NEG4 formülasyonunun ise 154,8 g idi. NEG4 formülasyonunun yayılabilirlik özelliği daha yüksektir.

Hazırlanan formülasyonlar incelendiğinde, hyalüronik asit ile hazırlanan NEG1 ve NEG2 nanoemüljellerinin daha yüksek yayılabilirliğe sahip olduğu ve uygulama sırasında daha avantajlı olduğu gözlemlenmiştir.

Biyoadezyon, istenen etki bölgesinde kalma süresini etkileyen ve ilaç salım süresini artıran bir faktördür (157). Bu özellik uzun süre temas gereken topikal formülasyonlar için önemlidir. Biyoadezyonu değerlendirmek için genellikle sıçan veya domuz derisi kullanılmaktadır, fakat insan derisine benzerliğinden dolayı domuz derisi tercih edilmektedir (107). Bu çalışmada da domuz derisi kullanılmıştır.

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonlarının biyoadezif özellikleri, tepe kuvveti, adezyon işi ve ayrılma mesafesi faktörleri olarak değerlendirilmiştir. NE11 nanoemülsiyon formülasyonuna hyalüronik asit ve Carbopol eklenerek hazırlanan iki nanoemülsiyon formülasyonu karşılaştırıldığında, hyalüronik asit eklenerek hazırlanan nanoemülsiyonun, Carbopol içeren nanoemülsiyona kıyasla daha yüksek biyoadezif özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

NE5 nanoemülsiyon formülasyonuna Carbopol polimeri eklenerek hazırlanan formülasyon, hyalüronik asit ile hazırlanan formülasyona kıyasla daha yüksek biyoadezif özellikler göstermiştir. Carbopol, polialkenil eterlerle çapraz bağlanmış akrilik asidin yüksek moleküler ağırlıklı bir polimeridir. Çalışmalar, Carbopol'ün selüloz türevleri gibi diğer polimerlere kıyasla daha iyi mukoadhezif özellikler ve daha iyi ilaç salım süresi sergilediğini göstermiştir (158).

Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi için agar difüzyon testi, mikrodilüsyon çalışması ve zamana bağlı öldürme eğrisi çalışması yapılmıştır. Agar difüzyon testi sonuçlarına göre, krem veya jel formülasyonları *C. acnes*'e karşı en güçlü antibakteriyel aktiviteyi (15-16 mm bölge çapı) ve *S. aureus*'a karşı en düşük aktiviteyi göstermiştir. NE11 ve NE5, *S. epidermidis* ve *C. acnes*'e karşı en güçlü aktiviteyi (12-14 mm bölge çapı) gösterirken, bu formülasyonlar *S. aureus*'a karşı sınırlı aktivite göstermiştir. Formülasyonların hiçbiri *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermemiştir.

Mikrodilüsyon çalışması sonuçlarına göre ise, difüzyon deneyine benzer şekilde, NE11 ve NE5 formülasyonları *S. epidermidis* ve *C. acnes*'e karşı en güçlü aktiviteyi (1/4 - 1/16 seyreltmeler) gösterirken, sırasıyla *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı herhangi bir antibakteriyel veya antifungal aktivite göstermemiştir. Çalışma boyunca, kalite kontrol suşu *S. aureus* ATCC 29213'ün MIC değerleri CLSI'nin doğruluk aralıkları içindedir.

MIC belirlemesi, herhangi bir maddenin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için altın standart olsa da bazen öldürücü etkilerini bilmek çok önemlidir. Çünkü bunların inhibitör özellikleri bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlar için yeterli olmayabilir. Bu çalışmada, nanoemülsiyonların MBC değerleri, MIC'lerine eşit veya iki kat daha büyüktür ve bu da güçlü bakterisidal etkilerini göstermektedir.

Zamana bağlı öldürme eğrisi çalışması sonuçları, *S. epidermidis* ATCC 12228'e karşı, başlangıçtakine kıyasla ≥3-Log10'luk güçlü bakterisidal azalma oranlarının, yalnızca NEG3 ve

NEG4 nanoemüljel formülasyonları tarafından 6. saatte elde edildiğini, E1 ve E2 formülasyonlarının ise difüzyon deneyi sonuçlarına benzer şekilde herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermediğini ortaya koymuştur. Öte yandan hem NE11 hem de NE5 formülasyonları 6. saatte 2,5-Log10 azalma oranlarına sahipken, 24. saatte beklendiği gibi yalnızca inhibitör aktivite göstermişlerdir.

Formülasyonların sitotoksisitesini değerlendirmek için *in vitro* biyouyumluluk testi yapılmıştır. Çalışma sonucunda hazırlanan formülasyonlarda artan konsantrasyonla birlikte hücre canlılığında anlamlı bir azalma ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. Uluslararası Standardizasyon Örgütü, sitotoksisite çalışmalarında %70'in üzerindeki hücre canlılığını sitotoksik olmayan bir etki olarak tanımlar (159). Bu çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, hyalüronik asit ilavesiyle hazırlanan NEG1 ve NEG2 nanoemüljellerinin %1 konsantrasyonda sitotoksik olmadığı ve hatta NEG2 nanoemüljelinde hücre büyümesi gösterdiği gözlemlenmiştir. NEG2 nanoemüljelinin %10 konsantrasyonda sitotoksik olmadığı da tespit edilmiştir. Ayrıca, hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla %10 ve %50 konsantrasyonlarda anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Uçucu yağın hücre canlılığı verileri ile uçucu yağ kullanılarak hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının verileri karşılaştırıldığında, nanoemüljellerin %1 konsantrasyondaki sitotoksisite verilerinin uçucu yağınkinden anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Hazırlanan nanoemüljellerin saf zencefil yağından daha biyouyumlu olduğu ve zencefil uçucu yağının nanoemüljel formülasyonu olarak uygulanmasının, zencefil uçucu yağının doğrudan uygulanmasına kıyasla sitotoksisiteyi azalttığı sonucuna varılabilir.

Çizik testi, hücre göçünün hızı ve kalıcılığı gibi faktörleri de içeren, yara iyileşme hızını değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir *in vitro* yöntemdir. Çalışmalar, antioksidan ve antienflamatuvar ajanlar içeren tedavilerin olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir (160). Bu çalışmada, antienflamatuvar özelliklere sahip olduğu bilinen zencefil uçucu yağının yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Başlangıçta, kontrol grubu, NEG1 grubu, NEG2 grubu ve uçucu yağ grubunun yara alanları %100'dür. 24 saat sonra, yara alanı kontrol grubunda %45,47'ye, NEG1 grubunda %19,05'e ve NEG2 grubunda %7,7'ye düşmüştür. NEG1 ve NEG2 gruplarındaki açık yara alanları, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Sadece zencefil uçucu yağı ile tedavi edilen yara alanındaki artış, zencefil uçucu yağının doğrudan uygulanmasının tahrişe veya toksisiteye neden olabileceğini düşündürmektedir. Bulgular, hazırlanan NEG1 ve NEG2 formülasyonlarının hücre göçünü teşvik ederek yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermekte olup, zencefil uçucu yağının yaralara doğrudan uygulanmasının

potansiyel olumsuz etkileri nedeniyle doğru formülasyonun oluşturulmasının önemini vurgulamaktadır.

Elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, zencefil uçucu yağı içeren nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri ile biyolojik etkinlikleri arasında uyumlu bir ilişki olduğu görülmektedir. Özellikle uygun damlacık boyutu ve homojen dağılım gösteren nanoemülsiyon sistemlerinin, jelleştirme sonrasında artan viskozite ve biyoadezyon özellikleri ile birlikte topikal uygulama açısından daha avantajlı hale geldiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, formülasyonların akneye neden olan mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal etki, sitotoksik olmaması ve *in vitro* yara iyileşmesini destekleyici özellikleri, geliştirilen sistemlerin yalnızca taşıyıcı değil, aynı zamanda terapötik açıdan da katkı sağlayan yapılar olduğunu ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, özellikle optimize edilen nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının akne ve akneye bağlı gelişen deri hasarlarının tedavisinde potansiyel bir yaklaşım sunduğu değerlendirilmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada zencefil uçucu yağı içeren nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonları geliştirilmiş ve detaylı şekilde incelenmiştir. Elde edilen veriler, formülasyonların uygun damlacık boyutu ve düşük PDI değerleri ile homojen bir yapı gösterdiğini ortaya koymuştur. Stabilite sonuçları, sistem davranışının hem içerik bileşimine hem de depolama sıcaklığına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. NE11 formülasyonu daha dengeli bir yapı sergilerken, NE5 formülasyonunda stabilitenin daha sınırlı olduğu görülmüştür. Düşük sıcaklıkta saklanan örneklerin daha iyi fiziksel özelliklerini koruduğu dikkat çekmiştir.

Biyolojik testler, geliştirilen sistemlerin akneye neden olan bakterilere karşı etkili olduğunu ve mikroorganizma yükünü azalttığını göstermiştir. Bunun yanında hem *in vitro* hem de *ex vivo* çalışmalar, formülasyonların yara kapanmasını desteklediğini göstermiştir. Sitotoksisite sonuçları ise nanoemülsiyon sistemlerinin, uçucu yağın doğrudan kullanımına göre daha güvenli olduğunu göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, geliştirilen nanoemülsiyon ve nanoemüljel sistemlerin akne tedavisinde ve akne çevresinde gelişen deri hasarlarının iyileşmesinde kullanılabilecek alternatif bir yaklaşım sunduğu anlaşılmaktadır. Özellikle uygun stabilite, düşük sitotoksisite ve belirgin antibakteriyel etki bir arada değerlendirildiğinde, bu sistemlerin topikal uygulamalar açısından dikkat çekici olduğu söylenebilir.

Bu çalışma, zencefil uçucu yağı içeren nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarının derinin hastalıklarında kullanılmak üzere literatüre katkı sağladığını ve ileri çalışmalar için temel oluşturduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçların daha güçlü şekilde desteklenebilmesi için ilerleyen çalışmalarda formülasyonların *in vivo* modellerde değerlendirilmesi ve farklı konsantrasyonların karşılaştırılması önerilmektedir. Ayrıca, uzun dönem stabilite çalışmalarının genişletilmesi ve farklı depolama koşullarında formülasyonların davranışlarının incelenmesi faydalı olacaktır. Bu doğrultuda yapılacak çalışmalar, geliştirilen sistemlerin akne vulgaris ve buna bağlı yara oluşumlarının tedavisindeki etkinliğinin ve güvenilirliğinin daha net ortaya konulmasına katkı sağlayabilir.

6. KAYNAKÇA

1. M. A. Richard *et al.*, “Prevalence of most common skin diseases in Europe: a population-based study”, 2022, doi: 10.1111/jdv.18050.
2. D. Z. Eichenfield, J. Sprague, and L. F. Eichenfield, “Management of Acne Vulgaris: A Review,” *JAMA*, vol. 326, no. 20, pp. 2055–2067, Nov. 2021, doi: 10.1001/JAMA.2021.17633.
3. E. Etcheverria, “Recognizing and treating five common dermatologic conditions seen in primary care,” *JAAPA*, vol. 33, no. 11, pp. 33–37, Nov. 2020, doi: 10.1097/01.JAA.0000718288.06130.DD.
4. J. Shi *et al.*, “Evaluation of some artificial food preservatives and natural plant extracts as antimicrobial agents for safety,” *Discover Food 2024 4:1*, vol. 4, no. 1, pp. 89-, Sep. 2024, doi: 10.1007/s44187-024-00162-z.
5. H. Jiang, Z. Xie, H. J. Koo, S. P. McLaughlin, B. N. Timmermann, and D. R. Gang, “Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal Zingiber species: Tools for authentication of ginger (Zingiber officinale Rosc.),” *Phytochemistry*, vol. 67, no. 15, pp. 1673–1685, Aug. 2006, doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2005.08.001.
6. R. Zhu, B. Morkos, and L. Liu, “Therapeutic Potentials and Encapsulation Strategies of Essential Oils,” *Processes 2026, Vol. 14,* vol. 14, no. 2, p. 335, Jan. 2026, doi: 10.3390/pr14020335.
7. M. Kumari, D. Gohil, and P. Sadhu, “Nanostructured lipid carriers for topical drug delivery: A comprehensive review of design, mechanisms, and therapeutic advances,” *Next Nanotechnology*, vol. 9, no. 36, p. 100367, Jun. 2026, doi: 10.1016/j.nxnano.2026.100367.
8. N. Gajula and C. B, “Development and Therapeutic Applications of Pharmaceutical Nanoemulsions in Modern Drug Delivery: Review Article,” *Journal of Pharma Insights and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 287–295, Apr. 2025, doi: 10.69613/ce2sxf34.
9. A. Ansari, M. Verma, and S. Majhi, “Nanoemulgel: A Comprehensive Review of Formulation Strategies, Characterization, Patents and Applications,” *Micro and Nanosystems*, vol. 17, no. 1, pp. 12–26, Jan. 2025, doi: 10.2174/0118764029316500240904074317.
10. J. KANITAKIS, “Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin,” *European Journal of Dermatology*, vol. 12, no. 4, pp. 390–401, Jul. 2002, Accessed: Jan. 11, 2026. (Online). Available: https://www.jle.com/en/revues/ejd/e-docs/anatomy_histology_and_immunohistochemistry_of_normal_human_skin_100285/article.phtml?tab=texte
11. M. Plotczyk and C. A. Higgins, “Skin biology,” *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*, pp. 3–25, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-102546-8.00001-7.
12. O. Arda, N. Göksügür, and Y. Tüzün, “Basic histological structure and functions of facial skin,” *Clin. Dermatol.*, vol. 32, no. 1, pp. 3–13, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.CLINDERMATOL.2013.05.021.
13. A. O. Seliem, A. Abd, E. Mahmoud, K. M. Ezzat, E. Gamal, and A. Allah, “An Overview on Histology of the skin,” *Int. J. Multiphys.*, vol. 18, no. 3, pp. 2932–2938, Sep. 2024, Accessed: Jan. 11, 2026. (Online). Available: https://themultiphysicsjournal.com/index.php/ijm/article/view/1910
14. S. Agarwal and K. Krishnamurthy, “Histology, Skin,” *StatPearls*, May 2023, Accessed: Jan. 11, 2026. (Online). Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/
15. J. M. L. White, H. Lui, C. G. Chute, R. Jakob, and R. J. G. Chalmers, “The WHO ICD-11 Classification of Dermatological Diseases: a new comprehensive online skin disease taxonomy designed by and for dermatologists,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 186, no. 1, pp. 178–179, Jan. 2022, doi: 10.1111/BJD.20656.
16. K. T. Clebak and M. A. Malone, “Skin Infections,” *Primary Care - Clinics in Office Practice*, vol. 45, no. 3, pp. 433–454, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.pop.2018.05.004.
17. H. P. Felgueiras, “An Insight into Biomolecules for the Treatment of Skin Infectious Diseases,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13071012.
18. A. Gurung and A. Badola, “An updated review on acne,” *Recent World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, vol. 14, no. 03, pp. 300–317, 2023, doi: 10.30574/wjbphs.2023.14.3.0266.
19. M. Toyoda and M. Morohashi, “Pathogenesis of acne,” *Med. Electron Microsc.*, vol. 34, no. 1, pp. 29–40, 2001, doi: 10.1007/S007950100002.
20. A. Podwojniak *et al.*, “Acne and the cutaneous microbiome: A systematic review of mechanisms and implications for treatments,” *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 39, no. 4, pp. 793–805, Apr. 2025, doi: 10.1111/JDV.20332.
21. M. Vasam, S. Korutla, and R. A. Bohara, “Acne vulgaris: A review of the pathophysiology, treatment, and recent nanotechnology based advances,” *Biochem. Biophys. Rep.*, vol. 36, p. 101578, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.BBREP.2023.101578.
22. D. M. Thappa and B. Adityan, “Profile of acne vulgaris--a hospital-based study from South India,” *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, vol. 75, no. 3, pp. 272–278, May 2009, doi: 10.4103/0378-6323.51244.

23. Y. Li, X. Hu, G. Dong, X. Wang, and T. Liu, “Acne treatment: research progress and new perspectives,” *Front. Med. (Lausanne).*, vol. 11, 2024, doi: 10.3389/FMED.2024.1425675/PDF.
24. M. T. Kalhoro *et al.*, “Fungicidal properties of ginger (Zingiber officinale) essential oils against Phytophthora colocasiae,” *Scientific Reports 2022 12:1*, vol. 12, no. 1, pp. 2191-, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-06321-5.
25. H. J. Akshitha, K. Umesha, and D. Prasath, “Morphological characterization of ginger (Zingiber officinale) using DUS descriptors,” *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 89, no. 10, pp. 1744–1747, Oct. 2019, doi: 10.56093/IJAS.V89I10.94643.
26. W. Lai *et al.*, “Zingiber officinale: A Systematic Review of Botany, Phytochemistry and Pharmacology of Gut Microbiota-Related Gastrointestinal Benefits,” *Am. J. Chin. Med. (Gard. City. N. Y).*, vol. 50, no. 4, pp. 1007–1042, 2022, doi: 10.1142/S0192415X22500410.
27. M. Kumari, M. Kumar, and S. S. Solankey, “Zingiber officinale Roscoe: Ginger,” pp. 605–621, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-38792-1_20.
28. H. Liu, C. D. Specht, T. Zhao, and J. Liao, “Morphological Anatomy of Leaf and Rhizome in Zingiber officinale Roscoe, with Emphasis on Secretory Structures,” *HortScience*, vol. 55, no. 2, pp. 204–207, Feb. 2020, doi: 10.21273/HORTSCI14555-19.
29. G. Zimazi, D. Montcho, R. I. Agbo, J. Aguia-Daho, A. Missihoun, and C. Agbangla, “Ethnobotanical Survey and Agro-Morphological Characterization of Ginger (Zingiber officinale Rosc., Zingiberaceae) Cultivars in South Benin,” *Annu. Res. Rev. Biol.*, vol. 37, no. 11, pp. 30–42, Oct. 2022, doi: 10.9734/ARRB/2022/V37I1130545.
30. M. Mahboubi, “Zingiber officinale Rosc. essential oil, a review on its composition and bioactivity,” *Clinical Phytoscience 2019 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 6-, Jan. 2019, doi: 10.1186/s40816-018-0097-4.
31. Z. A. A. Aziz *et al.*, “Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review,” *Curr. Drug Metab.*, vol. 19, no. 13, pp. 1100–1110, Jul. 2018, doi: 10.2174/1389200219666180723144850.
32. R. A. Syarif, F. Faradiba, T. K. Alyanti, and T. A. Savitri, “GC-MS Analysis of Ginger Rhizome with Various Extraction Methods,” *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, vol. 11, no. 3, pp. 107–114, Dec. 2024, doi: 10.33096/JFFI.V10I3.1105.
33. M. C. Mesomo, M. L. Corazza, P. M. Ndiaye, O. R. Dalla Santa, L. Cardozo, and A. D. P. Scheer, “Supercritical CO2 extracts and essential oil of ginger (Zingiber officinale R.): Chemical composition and antibacterial activity,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 80, pp. 44–49, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2013.03.031.
34. M. Mahboubi, “Zingiber Officinale Rosc. Essential Oil, A Review On İts Composition And Bioactivity,” *Clinical Phytoscience 2019 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2019, doi: 10.1186/S40816-018-0097-4.
35. S. Zhang *et al.*, “Essential oils of Zingiber officinale: Chemical composition, in vivo alleviation effects on TPA induced ear swelling in mice and in vitro bioactivities,” *Front. Nutr.*, vol. 9, p. 1043175, Oct. 2022, doi: 10.3389/FNUT.2022.1043175/BIBTEX.
36. X. Wang *et al.*, “Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus,” *Molecules 2020, Vol. 25, Page 3955*, vol. 25, no. 17, p. 3955, Aug. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25173955.
37. Y. Bellik, “Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of Zingiber officinale Roscoe,” *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 1, p. 40, Feb. 2014, doi: 10.1016/S2222-1808(14)60311-X.
38. C. Zhang, Y. Xie, W. Qiu, J. Mei, and J. Xie, “Antibacterial and Antibiofilm Efficacy and Mechanism of Ginger (Zingiber officinale) Essential Oil against Shewanella putrefaciens,” *Plants (Basel)*, vol. 12, no. 8, Apr. 2023, doi: 10.3390/PLANTS12081720.
39. S. Foustine, A. Andre, B. Setiadi, L. Y. Hartiadi, and A. A. T. Sahamastuti, “Comparison of Antimicrobial Activity between Ethanolic Extract and Essential Oil of Ginger (Zingiber officinale) against Food-borne Bacteria,” *Indonesian Journal of Life Sciences*, vol. 01, pp. 42–47, Sep. 2019, doi: 10.54250/IJLS.V1I2.21.
40. M. Rondanelli *et al.*, “Clinical trials on pain lowering effect of ginger: A narrative review,” *Phytotherapy Research*, vol. 34, no. 11, p. 2843, Nov. 2020, doi: 10.1002/ptr.6730.
41. M. Ding, M. J. Leach, and H. Bradley, “A Systematic Review of the Evidence for Topical Use of Ginger,” *EXPLORE*, vol. 9, no. 6, pp. 361–364, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.explore.2013.08.001.
42. M. Mahboubi, “Zingiber officinale Rosc. essential oil, a review on its composition and bioactivity,” *Clinical Phytoscience 2019 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 6-, Jan. 2019, doi: 10.1186/s40816-018-0097-4.
43. A. N. Forg, S. Hayati, R. Manzour, A. Saedikia, N. S. M. Taraghi, and E. Atabati, “Comparison of the Effectiveness of Aromatherapy Massage with Ginger and Sesame Oil on Joint Pain and Stiffness in Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Controlled Clinical Trial,” *Journal of Natural Remedies*, vol. 23, no. 4, pp. 1401–1410, Nov. 2023, doi: 10.18311/jnr/2023/32206.

44. A. K. Jain, S. Jain, M. A. S. Abourehab, P. Mehta, and P. Kesharwani, “An insight on topically applied formulations for management of various skin disorders,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 33, no. 18, pp. 2406–2432, 2022, doi: 10.1080/09205063.2022.2103625.
45. Y. H. Almoshari, “Novel Hydrogels for Topical Applications: An Updated Comprehensive Review Based on Source,” *Gels 2022, Vol. 8,* vol. 8, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/GELS8030174.
46. J. Hadgraft and M. E. Lane, “Advanced topical formulations (ATF),” *Int. J. Pharm.*, vol. 514, no. 1, pp. 52–57, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.065.
47. A. P. Raphael, G. Garrastazu, F. Sonvico, and T. W. Prow, “Formulation design for topical drug and nanoparticle treatment of skin disease,” *Ther. Deliv.*, vol. 6, no. 2, pp. 197–216, Feb. 2015, doi: 10.4155/TDE.14.106;WGROUP:STRING:PUBLICATION.
48. K. S. Bani and K. Bhardwaj, “Topical Drug Delivery Therapeutics, Drug Absorption and Penetration Enhancement Techniques,” *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 11, no. 4, pp. 105–110, Jul. 2021, doi: 10.22270/JDDT.V11I4.4864.
49. P. V Thushara, T. K. Ajith Babu, and M. Anas, “A Revıew On Formulatıon and Characterızatıon Of Cream,” *World Journal of Pharmaceutical Research www.wjpr.net* |, vol. 11, p. 239, 2015, doi: 10.20959/wjpr202213-25539.
50. S. Hagavane, S. Sonawane, A. Katkale, and V. Kunde, “Review On Cream As Topical Drug Delivery System,” *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences www.pharmacyjournal.in-2022*, vol. 7, no. 1, pp. 21–30, 2022, Accessed: Feb. 09, 2026. (Online). Available: www.pharmacyjournal.in
51. L. Chauhan and S. Gupta, “Creams: A Review on Classification, Preparation Methods, Evaluation and its Applications,” *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 10, no. 5-s, pp. 281–289, Oct. 2020, doi: 10.22270/jddt.v10i5-s.4430.
52. R. Tharun, K. Kranthi Kumar, K. Sahithi, K. Vani, D. Nikhitha, and G. Sandeep Kumar, “Comprehensive review on marketed products of skin creams,” *Future Journal of Pharmaceuticals and Health Sciences*, vol. 5, no. 3, pp. 51–63, Jul. 2025, doi: 10.26452/fjphs.v5i3.779.
53. Y. Man and C. Liu, “Review of Ointment Formulations in Modern Pharmaceutics,” *Scientific Journal of Technology*, vol. 4, no. 5, pp. 72–76, May 2022, doi: 10.54691/sjt.v4i5.762.
54. T. M. Barnes, D. Mijaljica, J. P. Townley, F. Spada, and I. P. Harrison, “Vehicles for Drug Delivery and Cosmetic Moisturizers: Review and Comparison,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 12, p. 2012, Dec. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122012.
55. C. Bhuyan, D. Saha, and B. Rabha, “A Brief Review on Topical Gels as Drug Delivery System,” *J. Pharm. Res. Int.*, pp. 344–357, Oct. 2021, doi: 10.9734/jpri/2021/v33i47a33020.
56. H. Soni, S. Kumawat, V. Sharma, and N. Ravindra, “An Overview on Topical Gel Drug Delivery Systems,” *International Journal of Health Advancement and Clinical Research (tz)*, vol. 2, no. 4, pp. 34–38, Dec. 2024, Accessed: Feb. 09, 2026. (Online). Available: https://ijhacr.com/index.php/ijhacr/article/view/56
57. C. Bhuyan, D. Saha, and B. Rabha, “A Brief Review on Topical Gels as Drug Delivery System,” *J. Pharm. Res. Int.*, pp. 344–357, Oct. 2021, doi: 10.9734/jpri/2021/v33i47a33020.
58. N. Raina, R. Rani, V. K. Thakur, and M. Gupta, “New Insights in Topical Drug Delivery for Skin Disorders: From a Nanotechnological Perspective,” *ACS Omega*, vol. 8, no. 22, pp. 19145–19167, Jun. 2023, doi: 10.1021/acsomega.2c08016.
59. L. L. Santos, E. L. Wu, K. M. Grinias, M. C. Koetting, and P. Jain, “Developability profile framework for lead candidate selection in topical dermatology,” *Int. J. Pharm.*, vol. 604, p. 120750, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120750.
60. M. Manian, P. Jain, D. Vora, and A. K. Banga, “Formulation and Evaluation of the In Vitro Performance of Topical Dermatological Products Containing Diclofenac Sodium,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 9, p. 1892, Sep. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14091892.
61. L. L. Santos, E. L. Wu, K. M. Grinias, M. C. Koetting, and P. Jain, “Developability profile framework for lead candidate selection in topical dermatology,” *Int. J. Pharm.*, vol. 604, p. 120750, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120750.
62. M. Manian, P. Jain, D. Vora, and A. K. Banga, “Formulation and Evaluation of the In Vitro Performance of Topical Dermatological Products Containing Diclofenac Sodium,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 9, p. 1892, Sep. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14091892.
63. A. Simões, F. Veiga, C. Vitorino, and A. Figueiras, “A Tutorial for Developing a Topical Cream Formulation Based on the Quality by Design Approach,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 107, no. 10, pp. 2653–2662, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.xphs.2018.06.010.
64. N. K. Verma, A. K. Singh, V. Yadav, P. C. Mall, and R. Jaiswal, “A Review On Nanoemulsion Based Drug Delivery System,” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, vol. 1, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2019, doi: 10.33545/26647222.2019.v1.i1a.6.

65. Shukla P. and Singh S., “A Complete Revıew On Nanoemulsıon,” *INDO AMERICAN Journal Of Pharmaceutical Sciences*, vol. 09, no. 01, pp. 266–272, 2022, Accessed: Feb. 21, 2026. (Online).
66. K. M. HAMID, M. WAIS, and G. SAWANT, “A Revıew On Nanoemulsıons: Formulatıon, Composıtıon, And Applıcatıons,” *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 14, pp. 22–28, Apr. 2021, doi: 10.22159/ajpcr.2021.v14i4.40859.
67. M. Jaiswal, R. Dudhe, and P. K. Sharma, “Nanoemulsion: An Advanced Mode Of Drug Delivery System,” *3 Biotech*, vol. 5, no. 2, pp. 123–127, Apr. 2015, doi: 10.1007/s13205-014-0214-0.
68. N. K. Verma, A. K. Singh, V. Yadav, P. C. Mall, and R. Jaiswal, “A Review On Nanoemulsion Based Drug Delivery System,” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, vol. 1, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2019, doi: 10.33545/26647222.2019.v1.i1a.6.
69. K. B. Sabjan, S. M. Munawar, D. Rajendiran, S. K. Vinoji, and K. Kasinathan, “Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review,” *Curr. Drug Res. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 4–15, Oct. 2020, doi: 10.2174/2589977511666191024173508.
70. K. B. Sabjan, S. M. Munawar, D. Rajendiran, S. K. Vinoji, and K. Kasinathan, “Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review,” *Curr. Drug Res. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 4–15, Oct. 2020, doi: 10.2174/2589977511666191024173508.
71. T. J. Ashaolu, “Nanoemulsions For Health, Food, And Cosmetics: A Review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 4, p. 3381, Aug. 2021, doi: 10.1007/s10311-021-01216-9.
72. V. V Changediya, R. Jani, and P. Kakde, “A Review on Nanoemulsions: A Recent Drug Delivery Tool,” *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 9, no. 5, pp. 185–191, Sep. 2019, doi: 10.22270/jddt.v9i5.3577.
73. G. P. Malode *et al.*, “A Critical Reveiw On Nanoemulsion: Advantages, Techniques And Characterization,” *https://wjarr.com/sites/default/files/WJARR-2021-0431.pdf*, vol. 11, no. 3, pp. 462–473, Sep. 2021, doi: 10.30574/wjarr.2021.11.3.0431.
74. N. Gajula and C. B, “Development and Therapeutic Applications of Pharmaceutical Nanoemulsions in Modern Drug Delivery: Review Article,” *Journal of Pharma Insights and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 287–295, Apr. 2025, doi: 10.69613/ce2sxf34.
75. N. Gajula and C. B, “Development and Therapeutic Applications of Pharmaceutical Nanoemulsions in Modern Drug Delivery: Review Article,” *Journal of Pharma Insights and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 287–295, Apr. 2025, doi: 10.69613/ce2sxf34.
76. V. V Changediya, R. Jani, and P. Kakde, “A Review on Nanoemulsions: A Recent Drug Delivery Tool,” *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 9, no. 5, pp. 185–191, Sep. 2019, doi: 10.22270/jddt.v9i5.3577.
77. T. J. Ashaolu, “Nanoemulsions For Health, Food, And Cosmetics: A Review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 4, p. 3381, Aug. 2021, doi: 10.1007/s10311-021-01216-9.
78. G. P. Malode *et al.*, “A Critical Reveiw on Nanoemulsion: Advantages, techniques and characterization,” *https://wjarr.com/sites/default/files/WJARR-2021-0431.pdf*, vol. 11, no. 3, pp. 462–473, Sep. 2021, doi: 10.30574/wjarr.2021.11.3.0431.
79. N. Gajula and C. B, “Development and Therapeutic Applications of Pharmaceutical Nanoemulsions in Modern Drug Delivery: Review Article,” *Journal of Pharma Insights and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 287–295, Apr. 2025, doi: 10.69613/ce2sxf34.
80. S. Shikalgar, M. A. Khule, and M. A. Godse, “International Journal of Current Science Research and Review A Review on Novel Drug Delivery System Nanoemulsion”, doi: 10.47191/ijcsrr/V5-i9-41.
81. T. J. Ashaolu, “Nanoemulsions For Health, Food, And Cosmetics: A Review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 4, p. 3381, Aug. 2021, doi: 10.1007/s10311-021-01216-9.
82. G. P. Malode *et al.*, “A Critical Reveiw on Nanoemulsion: Advantages, techniques and characterization,” *https://wjarr.com/sites/default/files/WJARR-2021-0431.pdf*, vol. 11, no. 3, pp. 462–473, Sep. 2021, doi: 10.30574/wjarr.2021.11.3.0431.
83. V. Gupta *et al.*, “Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements,” *Gels 2022, Vol. 8,* vol. 8, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/gels8030173.
84. N. Gajula and C. B, “Development and Therapeutic Applications of Pharmaceutical Nanoemulsions in Modern Drug Delivery: Review Article,” *Journal of Pharma Insights and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 287–295, Apr. 2025, doi: 10.69613/ce2sxf34.
85. Z. A. A. Aziz *et al.*, “Enrichment Of Eucalyptus Oil Nanoemulsion By Micellar Nanotechnology: Transdermal Analgesic Activity Using Hot Plate Test İn Rats’ Assay,” *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 13678-, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50134-y.
86. S. Shikalgar, M. A. Khule, and M. A. Godse, “International Journal of Current Science Research and Review A Review on Novel Drug Delivery System Nanoemulsion”, doi: 10.47191/ijcsrr/V5-i9-41.
87. R. K. DHAHIR *et al.*, “Nanoemulsions as Ophthalmic Drug Delivery Systems,” *Turk. J. Pharm. Sci.*, vol. 18, no. 5, pp. 652–664, Oct. 2021, doi: 10.4274/tjps.galenos.2020.59319.

88. M. Kumar, R. S. Bishnoi, A. K. Shukla, and C. P. Jain, “Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review,” *Prev. Nutr. Food Sci.*, vol. 24, no. 3, pp. 225–234, 2019, doi: 10.3746/pnf.2019.24.3.225.
89. M. Safaya and Y. C. Rotliwala, “Nanoemulsions: A Review On Low Energy Formulation Methods, Characterization, Applications And Optimization Technique,” *Mater. Today Proc.*, vol. 27, pp. 454–459, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2019.11.267.
90. A. M. Najan *et al.*, “Nanoemulsion: Formulation Techniques, Evaluation, Characterization And Application,” *J. Surv. Fish. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 207–213, 2022, doi: 10.53555/SFS.V9I1.1125.
91. D. V. Kumar, “Nanoemulsion Formulation And Characterization Techniques: A Review Study,” *Innovative Research Thoughts*, vol. 3, no. 7, pp. 165–173, Dec. 2017, Accessed: Mar. 01, 2026. (Online). Available: https://irt.shodhsagar.com/index.php/j/article/view/182
92. N. P. Kanwale, D. Gavali, D. Patil, R. Bhaskar, A. Dhas, and A. Dwivedi, “Nanoemulsıon: A New System For Drug Delıvery,” *Kanwale et al. World Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 4, p. 310, 2015, Accessed: Mar. 01, 2026. (Online). Available: www.wjpr.net
93. P. Shah, D. Bhalodia, and P. Shelat, “Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review,” *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 1, no. 1, pp. 24–32, Feb. 2010, doi: 10.4103/0975-8453.59509.
94. M. Jaiswal, R. Dudhe, and • P K Sharma, “Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system”, doi: 10.1007/s13205-014-0214-0.
95. S. D. Kayiran *et al.*, “Chemical Characterization, Cytotoxic Activity, and Antimicrobial Potential of Nanoemulsions Based on Cymbopogon citratus Essential Oils,” *ACS Omega*, vol. 10, no. 30, pp. 33932–33945, Aug. 2025, doi: 10.1021/acsomega.5c06077.
96. B. A. Khan, N. Ahmad, A. Alqahtani, R. Baloch, A. U. Rehman, and M. K. Khan, “Formulation Development Of Pharmaceutical Nanoemulgel For Transdermal Delivery Of Feboxostat: Physical Characterization And İn Vivo Evaluation,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 195, no. 22, p. 106665, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.ejps.2023.106665.
97. A. Rehman *et al.*, “Fabrication, In Vitro, and In Vivo Assessment of Eucalyptol-Loaded Nanoemulgel as a Novel Paradigm for Wound Healing,” *Pharmaceutics 2022, Vol. 14,* vol. 14, no. 9, Sep. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14091971.
98. A. Ansari, M. Verma, and S. Majhi, “Nanoemulgel: A Comprehensive Review of Formulation Strategies, Characterization, Patents and Applications,” *Micro and Nanosystems*, vol. 17, no. 1, pp. 12–26, Jan. 2025, doi: 10.2174/0118764029316500240904074317.
99. A. Ansari, M. Verma, and S. Majhi, “Nanoemulgel: A Comprehensive Review of Formulation Strategies, Characterization, Patents and Applications,” *Micro and Nanosystems*, vol. 17, no. 1, pp. 12–26, Jan. 2025, doi: 10.2174/0118764029316500240904074317.
100. D. R. Davare, N. D. Desai, and M. V. Mane, “Formulation and Evaluation of a Nanoemulgel for Enhancement of Topical Delivery and Anti-Inflammatory Activity of Flufenamic Acid,” Jun. 2025, doi: 10.21203/rs.3.rs-6865177/v1.
101. K. Morteza-Semnani *et al.*, “Development Of A Novel Nanoemulgel Formulation Containing Cumin Essential Oil As Skin Permeation Enhancer,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 1455–1465, Jun. 2022, doi: 10.1007/s13346-021-01025-1.
102. D. R. Davare, N. D. Desai, and M. V. Mane, “Formulation and Evaluation of a Nanoemulgel for Enhancement of Topical Delivery and Anti-Inflammatory Activity of Flufenamic Acid,” Jun. 2025, doi: 10.21203/rs.3.rs-6865177/v1.
103. A. A. Adem, A. Belete, M. L. Raorane, B. H. Junker, R. H. H. Neubert, and T. Gebre-Mariam, “Formulation And Evaluation Of Nanoemulgel Loaded With Essential Oils With Mosquito Repellent Activities,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 100, p. 105991, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.jddst.2024.105991.
104. K. Morteza-Semnani *et al.*, “Development Of A Novel Nanoemulgel Formulation Containing Cumin Essential Oil As Skin Permeation Enhancer,” *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 1455–1465, Jun. 2022, doi: 10.1007/s13346-021-01025-1.
105. A. M. Eid, H. Al-Hawari, S. Nazzal, and S. Khudarieh, “Development Of Vitis Vinifera Nanoemulgel And Evaluation Of İts Potential Anticancer, Antimicrobial And Anti-İnflammatory,” *BMC Complementary Medicine and Therapies 2025 25:1*, vol. 25, no. 1, pp. 47-, Feb. 2025, doi: 10.1186/s12906-025-04804-2.
106. M. R. Donthi, S. R. Munnangi, K. V. Krishna, R. N. Saha, G. Singhvi, and S. K. Dubey, “Nanoemulgel: A Novel Nano Carrier as a Tool for Topical Drug Delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 1, p. 164, Jan. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15010164.
107. D. K. Lal, B. Kumar, A. S. Saeedan, and M. N. Ansari, “An Overview of Nanoemulgels for Bioavailability Enhancement in Inflammatory Conditions via Topical Delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 4, p. 1187, Apr. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15041187.

108. N. Gajula and C. B, “Development and Therapeutic Applications of Pharmaceutical Nanoemulsions in Modern Drug Delivery: Review Article,” *Journal of Pharma Insights and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 287–295, Apr. 2025, doi: 10.69613/ce2sxf34.
109. C. R. Garcia *et al.*, “Nanoemulsion Delivery Systems For Enhanced Efficacy Of Antimicrobials And Essential Oils,” *Biomater. Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 633–653, Feb. 2022, doi: 10.1039/d1bm01537k.
110. N. AMIN and B. DAS, “A Revıew On Formulatıon And Characterızatıon Of Nanoemulsıon,” *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, pp. 1–5, Jul. 2019, doi: 10.22159/ijcpr.2019v11i4.34925.
111. V. Gupta *et al.*, “Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements,” *Gels 2022, Vol. 8,* vol. 8, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/gels8030173.
112. A. Nasır and E. Yabalak, “Investigation Of Antioxidant, Antibacterial, Antiviral, Chemical Composition, And Traditional Medicinal Properties Of The Extracts And Essential Oils Of The Pimpinella Species From A Broad Perspective: A Review,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 33, no. 5, pp. 411–426, Sep. 2021, doi: 10.1080/10412905.2021.1928559.
113. I. Zhelev *et al.*, “Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Fruits from Vitex agnus-castus L., Growing in Two Regions in Bulgaria,” *Plants 2022, Vol. 11, Page 896*, vol. 11, no. 7, p. 896, Mar. 2022, doi: 10.3390/PLANTS11070896.
114. E. Y. Al-Barghouthy, S. Hamed, G. F. Mehyar, and H. S. AlKhatib, “Comparative Evaluation of Spreadability Measurement Methods for Topical Semisolid Formulations/A Scoping Review,” *Gels*, vol. 11, no. 12, p. 1006, Dec. 2025, doi: 10.3390/gels11121006.
115. A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, “Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4_ts, pp. 493–496, Apr. 1966, doi: 10.1093/AJCP/45.4_TS.493.
116. D. Karakaş, F. Ari, and E. Ulukaya, “The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts,” *Turkish Journal of Biology*, vol. 41, no. 6, p. 919, 2017, doi: 10.3906/biy-1703-104.
117. R. Y. Ozturk and R. Cakir, “In Vitro Anticancer Efficacy Of Calendula Officinalis Extract-Loaded Chitosan Nanoparticles Against Gastric And Colon Cancer Cells,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 51, no. 9, pp. 1138–1148, 2025, doi: 10.1080/03639045.2024.2404143;SUBPAGE:STRING:ACCESS.
118. V. I. Babushok, P. J. Linstrom, and I. G. Zenkevich, “Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils”, doi: 10.1063/1.3653552.
119. M. Gibis, N. Rahn, J. Weiss, M. Gibis, N. Rahn, and J. Weiss, “Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes Containing Grape Seed Extract,” *Pharmaceutics 2013, Vol. 5, Pages 421-433*, vol. 5, no. 3, pp. 421–433, Aug. 2013, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS5030421.
120. S. Atun, R. Arianingrum, L. Cahyaningsih, F. A. Pratiwi, R. Kusumaningrum, and M. Khairuddean, “Formulatıon And Characterızatıon Of Quercıtrın Nanoemulsıon Isolated From Dendropthoe Falcata And Its Antıoxıdant Actıvıty Test,” *Rasayan J. Chem*, vol. 13, no. 3, pp. 1347–1356, 1347, doi: 10.31788/RJC.2020.1335868.
121. R. Kumar, S. A. Hussain, and D. Purkayastha, “Effect of Combination of Tween-80 with Amphiphilic Peptides on Physical Stability of Nanoemulsion Using Low-Energy Emulsification Technique,” *Asian Journal of Chemistry*, vol. 35, no. 4, pp. 905–909, Aug. 2023, doi: 10.14233/AJCHEM.2023.27569.
122. H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, and P. Finkel, “Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 28, no. 5, pp. 359–370, Oct. 2006, doi: 10.1111/J.1467-2494.2006.00344.X.
123. D. S. Alharbi *et al.*, “Ginger Oil Nanoemulsion Formulation Augments Its Antiproliferative Effect in Ehrlich Solid Tumor Model,” *Foods 2023, Vol. 12,* vol. 12, no. 22, Nov. 2023, doi: 10.3390/FOODS12224139.
124. Y. Liu *et al.*, “A deep learning system for differential diagnosis of skin diseases,” *Nat. Med.*, vol. 26, no. 6, pp. 900–908, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41591-020-0842-3.
125. S. H. Morariu *et al.*, “Predicting Factors and Clinical Characteristics of Pruritus in Psoriasis: A Cross-Sectional Survey,” ., vol. 14, no. 7, p. 827, Jul. 2024, doi: 10.3390/life14070827.
126. S. Atay and -Eskişehir Şehir Hastanesi Dermatoloji Kliniği, “DERMATOLOJİDE YAŞAM KALİTESİ,” *ESTUDAM Public Health Journal*, vol. 4, pp. 27–34, Mar. 2019, doi: 10.35232/estudamhsd.517027.
127. A. M. Albahlool *et al.*, “Common Dermatological Diseases in Saudi Arabia: A Literature Review,” *Egypt. J. Hosp. Med.*, vol. 67, no. 1, pp. 475–481, Apr. 2018, Accessed: Mar. 22, 2026. (Online). Available: https://ejhm.journals.ekb.eg/article_14028.html
128. D. L. Guguluș *et al.*, “The Epidemiology of Acne in the Current Era: Trends and Clinical Implications,” *Cosmetics 2025, Vol. 12,* vol. 12, no. 3, May 2025, doi: 10.3390/cosmetics12030106.
129. A. S. Moffarah, M. Al Mohajer, B. L. Hurwitz, and D. G. Armstrong, “Skin and Soft Tissue Infections,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 4, Aug. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0014-2015.

130. S. Robinson, “Topical Treatments for Skin Disorders: An Overview of Efficacy and Application,” *Research in Clinical Dermatology*, vol. 7, no. 6, doi: 10.35841/aarcd-7.6.233.
131. V. Foy, D. L. Fischer, N. Tilin, G. Litchman, and A. J. Friedman, “Pharmacological Complications in Ocular Dermatology: A Review and Update,” *Journal of Drugs in Dermatology*, vol. 23, no. 12, pp. 1100–1105, Dec. 2024, doi: 10.36849/JDD.8236.
132. S. Sonwari, I. Beenish Gulzar, T. Fatima, N. Bagh Srinagar Kashmir, S. Azmat, and B. Gulzar, “Ginger and its health benefits: A review,” *International Journal of Unani and Integrative Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 64–69, Jan. 2019, doi: 10.33545/2616454x.2019.v3.i1b.78.
133. M. Mahboubi, “Zingiber Officinale Rosc. Essential Oil, A Review On İts Composition And Bioactivity,” *Clinical Phytoscience 2019 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 6-, Jan. 2019, doi: 10.1186/s40816-018-0097-4.
134. Y. Hunde, A. Bachheti, K. K. Chaubey, A. Husen, and R. K. Bachheti, “Nanoemulsions from Essential Oils: Preparation, Characterization, and Their Applications,” pp. 21–38, 2023, doi: 10.1007/978-981-99-5398-1_2.
135. C. Li, Y. Mo, L. Jiao, Y. Liu, and X. Li, “Synthesis and Characterization of Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with P-Cymene against Rice Bacterial Blight,” *Nanomaterials*, vol. 14, no. 3, Feb. 2024, doi: 10.3390/nano14030250.
136. M. H. Sultan *et al.*, “Development and Optimization of Methylcellulose-Based Nanoemulgel Loaded with Nigella sativa Oil for Oral Health Management: Quadratic Model Approach,” *Molecules*, vol. 27, no. 6, p. 1796, Mar. 2022, doi: 10.3390/molecules27061796.
137. P. C. Onyenekwe and S. Hashimoto, “The Composition Of The Essential Oil Of Dried Nigerian Ginger (Zingiber Officinale Roscoe),” *European Food Research and Technology*, vol. 209, no. 6, pp. 407–410, 1999, doi: 10.1007/S002170050517/METRICS.
138. Preeti *et al.*, “Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs,” *Scientifica (Cairo).*, vol. 2023, p. 6640103, 2023, doi: 10.1155/2023/6640103.
139. S. Jacob, F. S. Kather, S. H. S. Boddu, J. Shah, and A. B. Nair, “Innovations in Nanoemulsion Technology: Enhancing Drug Delivery for Oral, Parenteral, and Ophthalmic Applications,” *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 10, p. 1333, Oct. 2024, doi: 10.3390/pharmaceutics16101333.
140. S. L. Ee, X. Duan, J. Liew, and Q. D. Nguyen, “Droplet Size And Stability Of Nano-Emulsions Produced By The Temperature Phase İnversion Method,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 140, no. 1–3, pp. 626–631, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.cej.2007.12.016.
141. Q. Liu, H. Huang, H. Chen, J. Lin, and Q. Wang, “Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds,” *Molecules*, vol. 24, no. 23, p. 4242, Nov. 2019, doi: 10.3390/molecules24234242.
142. J. Kim, Y. Noh, D. J. McClements, and S. J. Choi, “Impact of hydrophilic substances on Ostwald ripening in emulsions stabilized by varied hydrophilic group surfactants,” *npj Science of Food 2024 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 76-, Oct. 2024, doi: 10.1038/s41538-024-00316-4.
143. S. J. Hunter, P. Chohan, S. Varlas, and S. P. Armes, “Effect of Temperature, Oil Type, and Copolymer Concentration on the Long-Term Stability of Oil-in-Water Pickering Nanoemulsions Prepared Using Diblock Copolymer Nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 40, no. 7, p. 3702, 2024, doi: 10.1021/acs.langmuir.3c03423.
144. Y. Jin, D. Liu, and J. Hu, “Effect of Surfactant Molecular Structure on Emulsion Stability Investigated by Interfacial Dilatational Rheology,” 2021, doi: 10.3390/polym13071127.
145. L. Guanghui *et al.*, “Preparation, Stability, And İn Vitro Transport Of Soybean Protein-Based Diosgenin Nanoemulsions,” *Food Chem. X*, vol. 20, no. 2, p. 100982, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.fochx.2023.100982.
146. Y. N. Ashagrie, M. G. Tadesse, R. K. Bachheti, G. Nijhawan, S. Tyagi, and A. Bachheti, “Formulation and characterization of Caesalpinia decapetala seed oil nanoemulsion: physicochemical properties, stability, and antibacterial activity,” *Scientific Reports 2025 15:1*, vol. 15, no. 1, pp. 14598-, Apr. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-87732-y.
147. J. Liu *et al.*, “Study on the kinetics of formation process of emulsion of heavy oil and its functional group components,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, p. 8916, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-59637-9.
148. P. Clua *et al.*, “The Role of Alveolar Macrophages in the Improved Protection against Respiratory Syncytial Virus and Pneumococcal Superinfection Induced by the Peptidoglycan of Lactobacillus rhamnosus CRL1505,” *Cells*, vol. 9, no. 7, p. 1653, Jul. 2020, doi: 10.3390/cells9071653.
149. E. H. Ofstad, J. C. Frich, E. Schei, R. M. Frankel, and P. Gulbrandsen, “What is a medical decision? A Taxonomy Based On Physician Statements İn Hospital Encounters: A Qualitative Study,” *BMJ Open*, vol. 6, no. 2, p. e010098, 2016, doi: 10.1136/bmjopen-2015-010098.
150. E. H. Ofstad, J. C. Frich, E. Schei, R. M. Frankel, and P. Gulbrandsen, “What İs A Medical Decision? A Taxonomy Based On Physician Statements İn Hospital Encounters: A Qualitative Study,” *BMJ Open*, vol. 6, no. 2, p. e010098, 2016, doi: 10.1136/bmjopen-2015-010098.
151. D. Zhao, X. Zhou, and W. Wu, “A Metamodel-Based Multi-Scale Reliability Analysis of FRP Truss Structures under Hybrid Uncertainties,” *Materials*, vol. 17, no. 1, p. 29, Jan. 2023, doi: 10.3390/ma17010029.

152. D. Zhao, X. Zhou, and W. Wu, “A Metamodel-Based Multi-Scale Reliability Analysis of FRP Truss Structures under Hybrid Uncertainties,” *Materials*, vol. 17, no. 1, p. 29, Jan. 2023, doi: 10.3390/ma17010029.
153. D. Zhao, X. Zhou, and W. Wu, “A Metamodel-Based Multi-Scale Reliability Analysis of FRP Truss Structures under Hybrid Uncertainties,” *Materials*, vol. 17, no. 1, p. 29, Jan. 2023, doi: 10.3390/ma17010029.
154. Q. Liu, H. Huang, H. Chen, J. Lin, and Q. Wang, “Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds,” *Molecules*, vol. 24, no. 23, p. 4242, Nov. 2019, doi: 10.3390/molecules24234242.
155. S. J. Hunter, P. Chohan, S. Varlas, and S. P. Armes, “Effect of Temperature, Oil Type, and Copolymer Concentration on the Long-Term Stability of Oil-in-Water Pickering Nanoemulsions Prepared Using Diblock Copolymer Nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 40, no. 7, p. 3702, 2024, doi: 10.1021/acs.langmuir.3c03423.
156. Q. Liu, H. Huang, H. Chen, J. Lin, and Q. Wang, “Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds,” *Molecules*, vol. 24, no. 23, p. 4242, Nov. 2019, doi: 10.3390/molecules24234242.
157. B. Palcsó, Z. Moldován, K. Süvegh, A. Herczegh, and R. Zelkó, “Chlorine Dioxide-Loaded Poly(Acrylic Acid) Gels For Prolonged Antimicrobial Effect,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 98, pp. 782–788, May 2019, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.01.043.
158. Mrs. S. Shyamla, Mr. S. Jeevanandham, and V. G. B, “Mucoadhesive Drug Delivery System,” *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, vol. Volume-6, no. Issue-2, 2022, Accessed: Dec. 26, 2025. (Online). Available: www.ijtsrd.com
159. A. D. R. Teixeira *et al.*, “Miconazole-Loaded Nanoparticles Coated With Hyaluronic Acid To Treat Vulvovaginal Candidiasis,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 188, p. 106508, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.EJPS.2023.106508.
160. P. Aydın, Z. Karaköy, and H. Halıcı, “Evaluation of Wound Healing Potential of Galangin on L929 Mouse Fibroblast Cell Lines Using In Vitro Scratch Assay,” *Current Research in Health Sciences*, vol. 1, no. 3, pp. 99–104, Oct. 2024, doi: 10.5281/ZENODO.13976728.