

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pektin-aşı-poli (N,N-dietilakrilamid) Kopolimerlerinin Sentezi ve Mikrokürelerden
5-Fluorourasilin Sıcaklık Kontrollü Salımı

Şeyma TOKMAK

EYLÜL 2017

Kimya Anabilim Dalında Şeyma TOKMAK tarafından hazırlanan PEKTİN-AŞI-POLİ(N,N-DİETİLAKRİLAMİD) KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE MİKROKÜRELERDEN 5-FLUOROURASİLİN SICAKLIK KONTROLLÜ SALIMI adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Emine BULUT

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

Üye : Doç. Dr. Ayşegül Ülkü METİN

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

PEKTİN-AŞI-POLİ(N,N-DİETİLAKRİLAMİD) KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE MİKROKÜRELERİNDEN 5-FLUOROURASİLİN SICAKLIK KONTROLLÜ SALIMI

TOKMAK, Şeyma

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

Eylül 2017, 117 sayfa

Bu çalışmada, pektin polimerine mikrodalgada N,N-dietilakrilamid monomerinin aşılması ve aşı kopolimerlerin sıcaklığa duyarlı oral ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanılması hedeflenmiştir. Pektin-aşı-poli(N,N-dietilakrilamid) aşı kopolimerlerin yapıları Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR-Raman), nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (^1H -NMR, ^{13}C -NMR), termogravimetrik analizler (DSC, TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-ışını difraksiyonu (XRD), jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile aydınlatılmıştır. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine tepkime süresi, tepkime sıcaklığı, başlatıcı derişimi, mikrodalga gücü, N,N,N',N' tetrametiletilediamin (TEMED), monomer, nitrik asit (HNO_3), pektin derişimlerinin etkileri çalışılmıştır. Optimum koşullar; 4 saat süreyle $35\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1200 Watt gücünde, $4,5 \times 10^{-3}\text{ M}$ seryum amonyum nitrat, $1,98 \times 10^{-3}\text{ M}$ TEMED, 0,548 M monomer, 0,02 M nitrik asit, 2 g/dL pektin derişimlerinde bulunmuştur. Termal analiz sonuçlarından sentezlenen kopolimerlerin pektine göre termal dayanımının yüksek olduğu bulundu.

Çalışmanın ikinci bölümünde, Pek-aşı-PDEAAm kopolimeri 5-Fluorourasil (5-FU) model ilacı ile oral mikroküre uygulamasında kullanılmıştır. Pek-aşı-PDEAAm mikroküreleri kitosan kaplı ve ZnCl_2 ile çapraz bağlanarak hazırlandı. Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerindeki ilaç polimer etkileşimleri ATR-FTIR ve XRD ile, termal davranışları DSC ile, yüzey morfolojileri SEM ve AFM ile karakterize

edilmiştir. İlaç yüklü mikroküreler tutuklanma verimleri, partikül boyutları ile karakterize edildi. Boş mikrokürelerin farklı pH ve sıcaklıktaki şişme dereceleri incelendi. Mikrokürelerden ilaç salımına aşı yüzdesinin, ilaç/polimer oranının, çapraz bağlayıcı derişiminin, çapraz bağlama süresinin, pH ve sıcaklığın etkileri araştırıldı. Aşı yüzdesi 14 olan mikrokürelerde sıcaklığın 25 °C'den 37 °C'ye artırılmasıyla yüzde 5-FU salım sonucu 99'dan 81'e, aşı yüzdesi 75 olan mikrokürelerde 76'dan 65'e azaldı. Mikrokürelerin 5-FU yüzde salımı ve şişme derecesi verilerinden sıcaklığa duyarlılık gösterdikleri ve kontrollü salım gerçekleştirdikleri tespit edildi.

Kinetik parametreler salım sonuçlarından yararlanılarak Peppas eşitliği ile belirlendi. Difüzyon katsayısı Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerden ilacın difüzyonu için hesaplandı ve salım sonuçları ile uyumlu değerler bulundu.

Anahtar Kelimeler: Pektin, Kitosan, 5-Fluorourasil, N,N-dietilakrilamid (DEAAm), Aşı kopolimer, Kontrollü salım, Sıcaklık duyarlı sistemler, Seryum amonyum nitrat (CAN).

ABSTRACT

SYNTHESIS OF PECTIN-g-POLY(N,N DIETHYLACRYLAMIDE) COPOLYMERS AND TEMPERATURE-CONTROLLED RELEASE OF 5- FLUOROURACIL FROM THE MICROSPHERES

TOKMAK, Şeyma

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, M.Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

September 2017, 117 pages

In this study, it was aimed to grafting of N,N-diethylacrylamide (DEAAm) monomer onto pectin and use of graft copolymer in the temperature sensitive oral drug delivery systems. Pectin-graft-(N,N-diethylacrylamide) copolymers were characterized by ATR-FTIR, Raman, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DSC, TGA, SEM, XRD and GPC. The effects of reaction time, reaction temperature, initiator concentration, microwave power, TEMED, monomer, HNO_3 , pectin concentrations on the graft yield and grafting efficiency were investigated. The optimum grafting conditions were obtained with a reaction time of 4 h, reaction temperature of 35 °C, microwave power of 1200 watt, CAN concentration of 4.5×10^{-3} M, TEMED concentration of 1.98 M, PDEAAm of 0.548 M, HNO_3 of 0.02 M and percentage of pectin 2 g/dL. Thermal stability of the synthesized copolymers were found to be higher than that of pectin.

In the second part of the study, Pec-g-PDEAAm copolymer microspheres containing 5-Fluorouracil (5-FU) as a model drug were used in oral microsphere application. Chitosan coated Pec-g-PDEAAm microspheres were prepared by crosslinking with ZnCl_2 . Drug-polymer interactions of Pec-g-(PDEAAm) microspheres were characterized by FTIR and XRD. Thermal behavior of them were investigated by DSC and TGA, while the surface morphologies of the microspheres were analyzed using SEM and AFM. Moreover, drug loaded microspheres were characterized by

entrapment efficiency and particles size. Swelling degrees of empty microspheres were carried out at different pH and temperature. Effect of graft percentage, polymer concentration, drug/polymer ratio, crosslinking agent concentration, crosslinking time, pH and temperature on the release of drug from the microspheres were examined. Percentage of 5-FU release from microspheres with 14 grafting percentage decreased from 99 to 81 with increasing temperature from 25 °C to 37 °C while 5-FU release from the microspheres with 75 grafting percentage decreased from 76 to 65. Release behavior and swelling degree of microspheres showed that obtained microspheres are thermoresponsive and be able to control the drug release.

Kinetic parameters were determined by using release results with Peppas equation. The diffusion coefficients were calculated for the transport of drug through the Pec-g-PDEAAm microspheres and the results were found in consistence with the release results.

Key words: Pectin, Chitosan, 5-Fluorouracil, N,N-diethylacrylamide (DEAAm), Graft copolymer, Controlled release systems, Temperature sensitive systems, Cerium ammonium nitrate (CAN).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, başlangıcından sonuna kadar, gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, karşılaştığım problemlerin çözümünde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hoşgörölü ve sabırlı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Deney çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Arş.Gör. Fatma KURŞUN, Alper AKIN, Arş.Gör. Enes GÜNCÜM, Zeynep ALTINIŞIK, Nur Benan FINDIK ve Ümit Haydar EROL'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmamda maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK'a) (Proje No:113Z271) teşekkürlerimi sunarım. Sentezlenen kopolimer ve mikrokürelerin yapılarının aydınlatılmasında yardımlarından dolayı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Merkezi Araştırmalar Laboratuvarları Çalışanları'na, ODTÜ ve Bilkent Merkezi Laboratuvar Çalışanları'na, Selçuk Üniversitesi Kimya Bölümü, NMR Laboratuvar Çalışanları'na teşekkür ederim.

Ayrıca bu zorlu çalışmada ve yaşıntımın her anında yanımda olup maddi ve manevi her türlü desteği veren ailem ve kuzenlerime en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Polimerlerin Genel Tanımı	3
1.2. Uyarıya Duyarlı Polimerler	3
1.3. Sıcaklığa Duyarlı Polimerler	4
1.3.1. Negatif sıcaklık duyarlı polimerler	5
1.3.2. Pozitif sıcaklık duyarlı polimerler	5
1.4. pH-Duyarlı Polimerler.....	6
1.5. Işık Duyarlı Polimerler	8
1.6. Elektrik Alana Duyarlı Polimerler.....	9
1.7. Manyetik Alana Duyarlı Polimerler	9
1.8. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	10
1.8.1. Salım Mekanizmasına Göre Kontrollü Salım Sistemleri.....	10
1.8.1.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler	11
1.8.1.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler.....	13
1.8.1.3. Şişme Kontrollü Sistemler	14
1.9. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Uygulama Yolları.....	15
1.10. İlaç Salım Kinetiği.....	16
1.11. Mikroküreler.....	19
1.12. Çalışmada Kullanılan Polimerler ve İlaçlar.....	20
1.12.1. Pektin	20
1.12.2. Kitosan	20
1.12.3. Poli (N,N-dietilakrilamid) (PDEAAm)	21

1.12.4. 5-Fluorourasil (5-FU)	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Kimyasal Maddeler	23
2.2. Cihazlar	23
2.3. Mikrodalga Destekli Pek-aşı-PDEAAm Sentezi.....	24
2.4. Oral Uygulama İçin İlaç Yüklü Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerin Hazırlanması	26
2.5. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinin Şişme Derecelerinin Tayini	27
2.6. Mikrokürelerin İlaç Tutuklanma Verimlerinin Belirlenmesi	28
2.7. 5-FU'nun Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinden Salım Çalışması.....	28
2.8. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinde MTT Çalışması	28
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	31
3.1. Pektin Aşı Kopolimerizasyonu.....	31
3.2. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Kopolimerinin Yapısal Karakterizasyonu.....	32
3.2.1. Pektin, Pek-aşı-PDEAAm ve PDEAAm'ın FTIR ve RAMAN Sonuçlarının Değerlendirilmesi	32
3.2.2. DSC Sonuçlarının Değerlendirilmesi	36
3.2.3. TGA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	38
3.2.4. ¹³ C-NMR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
3.2.5. ¹ H-NMR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
3.2.6. Pektin ve Aşı Kopolimer SEM Analizi	44
3.2.7. GPC-SEC Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	46
3.2.8. Pek-aşı-PDEAAm Kopolimerlerinin LCST Değerlerinin Belirlenmesi	48
3.3. Optimizasyon Parametreleri	49
3.3.1. Aşılama Üzerine Süre Etkisi.....	49
3.3.2. Aşılama Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	50
3.3.3. Aşılama Üzerine Mikrodalga Gücü Etkisi.....	51
3.3.4. Aşılama Üzerine CAN Derişimi Etkisi.....	51
3.3.5. Aşılama Üzerine TEMED Derişimi Etkisi	53
3.3.6. Aşılama Üzerine Monomer Derişimi Etkisi	54

3.3.7. Aşılama Üzerine HNO ₃ Derişim Etkisi	55
3.3.8. Aşılama Üzerine Pektin Derişimi Etkisi	56
3.4. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinden 5 Fluorourasil Salım Çalışması.....	58
3.4.1. Hazırlanan Mikrokürelerin Çap ve Tutuklanma Verim Değerleri.....	58
3.4.2. Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinin FTIR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	60
3.4.3. 5-FU ve Pek-aşı-PDEAAm ₄ Mikrokürelerin DSC Termogramınının Değerlendirilmesi.....	62
3.4.4. Hazırlanan Mikrokürelerin SEM Analizi	64
3.4.5. AFM Analiz Sonuçları.....	66
3.4.6. Hazırlanan Mikrokürelerin Optik Mikroskop Görüntüleri	68
3.4.7. X-Işını Difraksiyonu (XRD).....	68
3.4.8. Pek-aşı-PDEAAm aşı kopolimerin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerin MTT Sonuçları	70
3.4.9. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerin LCST sonuçları	72
3.5. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinden İlaç Salımı ve Şişme Çalışması.....	73
3.5.1. Aşı Yüzdesinin 5-FU Salıma ve Şişme Derecesine Etkisi	73
3.5.2. Sıcaklığın 5-FU Salımına ve Şişme Derecesine Etki	74
3.5.3. İlaç/Polimer Oranının 5-Fluorourasil Salımına Etkisi	78
3.5.4. Kitosan Yüzdesinin 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi	80
3.5.6. ZnCl ₂ Derişiminin 5-FU Salıma ve Şişme Derecesine Etkisi.....	82
3.5.7. Çapraz Bağlama Süresinin 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi	84
3.5.8. pH Değişiminin 5-FU Salımına ve Şişme Derecesine Etkisi	86
3.6. Aynı Tampon ve Farklı Sıcaklıklarda Tüm Gün Boyuca Salım ve Şişme Etkisi	88
3.6.1. Pek-aşı-PDEAAm (P ₁) Mikrokürelerinde Sıcaklığın 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi.....	88
3.6.2. % 56 Aşı Yüzdeli (P ₄) Mikrokürelerinde Sıcaklığın 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi.....	91
3.6.3. % 75 Aşı Yüzdeli (P ₅) Mikrokürelerde Sıcaklığın 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi.....	94

3.7. Kinetik Sonuçlar	98
4. SONUÇLAR	100
KAYNAKLAR	103



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Sayfa

1.1. Uyarı-cevap Polimerleri (a) Çözeltide, (b) Ara-yüzeyde ve (c) Hidrojel halinde.....	4
1.2. pH'ya karşı duyarlı anyonik ve katyonik mikroküre davranışları	8
1.3. Plazmadaki ilaç derişiminin zamanla değişimi (MED: Minimum Etkili Derişim; MTD: Minimum Toksik Derişim)	11
1.4. Difüzyon kontrollü ilaç salım sistemlerinin sınıflandırılması (Co başlangıç ilaç derişimi; Cs ilaç çözünürlüğü)	12
1.5. Biyobozunur sistemden ilaç salımı ((a) yığın erozyonu, (b) yüzey erozyonu)	13
1.6. Zincire takılı sistemden ilaç salımı	14
1.7. Hidrojel tabletin camsı ve elastığimsi halleri.....	14
1.8. Enjeksiyonda ilaç bütün vücuda yayılırken, bölgeye özel salımda yalnızca hedeflenmiş bölgede salım meydana gelir	16
1.9. Pektinin yapısı.....	20
1.10. Kitosanın yapısal formülü	21
1.11. Poli(N,N-dietilakrilamid)'in kimyasal yapısı.....	21
1.12. 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı	22
2.1. Pek-aşı-PDEAAm aşı kopolimerinin oluşum şeması	26
2.2. Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin oluşumu	27
3.1. Pektin, PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm'nin FTIR spektrumu.....	33
3.2. PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm'in Raman spektrumları.....	35
3.3. Pektin ve farklı aşı yüzdelerdeki kopolimerlerin DSC termogramı.....	37
3.4. Pektin ve farklı aşı yüzdelerindeki kopolimerlerin TGA termogramı	39
3.5. Pektin ve farklı aşı yüzdelerindeki kopolimerlerin DTGA termogramı	39
3.6. Pektinin 13C-NMR spektrumu	40
3.7. PDEAAm'nin 13C-NMR spektrumu.....	41
3.8. Pek-aşı-PDEAAm'nin 13C-NMR spektrumu.....	42
3.9. Pektinin 1H-NMR spektrumu	43
3.10. PDEAAm'nin H-NMR spektrumu.....	43

3.11. Pek-aşı-PDEAAm'nin 1H-NMR spektrumu	44
3.12. Pektinin SEM fotoğrafları (a) 35, (b) 500, (c) 2500 ve (d) 5000 büyütme.....	45
3.13. Aşı kopolimerin SEM fotoğrafları (a) 35, (b) 500, (c) 2500 ve (d) 5000 büyütme	46
3.14. Pektin ve aşı kopolimerlerin SEC alıkonma zaman değişimleri	47
3.15. Pektin ve farklı aşı kopolimerlerin sıcaklıkla geçirgenliklerinin değişimi	48
3.16. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine süre etkisi	49
3.17. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine sıcaklık etkisi.....	50
3.18. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine mikrodalga gücü etkisi	51
3.19. Pektin CAN mekanizması	52
3.20. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine CAN derişimi etkisi.....	52
3.21. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine TEMED derişim etkisi	53
3.22. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine monomer derişim etkisi.....	54
3.23. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine nitrik asit derişim etkisi	55
3.24. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine pektin yüzdesinin etkisi.....	56
3.25. Pek-aşı-PDEAAm kimyasal yapısı	57
3.26. 5-FU (a), Pek-aşı-PDEAAm boş mikroküre (b) ve 5-FU yüklü Pek-aşı- PDEAAm mikrokürelerin (c) FTIR spektrumları.....	62
3.27. Pek-aşı-PDEAAm4 ve (ilaçlı) Pek-aşı-PDEAAm4 mikrokürelerinin DSC termogramı.....	63
3.28. 5-FU'in DSC termogramı	63
3.29. (a) 50 büyütme boş pektin mikroküresi ve (b) 50 büyütme boş Pek-aşı- PDEAAm mikroküreleri SEM fotoğrafları.....	64
3.30. (a) 2500 büyütme pektin ve (b) 2500 büyütme Pek-aşı-PDEAAm4 mikrokürelerinin SEM fotoğrafları.....	65
3.31. (a) 50 büyütme 5-FU yüklü Pek-aşı-PDEAAm4 mikroküre kesiti ve (b) 50 büyütme 5-FU yüklü Pek-aşı-PDEAAm1 mikrokürelerinin çapraz kesiti.....	65
3.32. (a) 1000 büyütme 2saat çapraz bağı mikroküre ve (b) 1000 büyütme 30dk çapraz bağı mikroküre SEM fotoğrafları.....	66
3.33. % 56'lık aşı yüzdeli (a,b) ve %75 aşı yüzdeli (c,d) mikrokürelerin AFM görüntüsü	67

3.34. Mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri a) %56 verimli ilaçlı mikroküre b) % 56 verimli boş mikroküre	68
3.35. 5-FU, boş Pek-aşı-PDEAAm4, ilaçlı Pek-aşı-PDEAAm4 Mikrokürelerin XRD Deseni.....	69
3.36. Pektin (1), % 56 kopolimer (2) ve % 56 mikrokürenin (3) % hücre canlılığı-derişim değişimi.....	70
3. 37. İkili boyama ile apoptotik ve nekrotik hücrelerin gösterilmesi	71
3.38. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin LCST şişme davranışları	72
3.39. Aşı yüzdesinin 5-FU salımına etkisi	74
3.40. Aşı yüzdesinin şişme derecesine etkisi	74
3.41. % 14 aşı yüzdeli (A), % 56 aşı yüzdeli (B) ve % 75 aşı yüzdeli (C) mikrokürelerde 5-FU salımına sıcaklık etkisi.....	76
3.42. %14 aşı yüzdeli (A), % 56 aşı yüzdeli (B) ve % 75 aşı yüzdeli (C) mikrokürenin şişme derecesi	77
3.43. 5-FU'nun aşı kopolimer ile etkileşimi	79
3.44. İlaç/polimer oranının 5-FU salıma etkisi	79
3.45. Kitosan yüzdesinin 5-FU salıma etkisi	81
3.46. Kitosan yüzdesinin şişme derecesine etkisi	81
3.47. Pek-aşı-PDEAAm ile ZnCl ₂ çapraz bağlanma mekanizması.....	83
3.48. ZnCl ₂ derişiminin 5-FU salımına etkisi	83
3.49. ZnCl ₂ derişiminin şişme derecesine etkisi	84
3.50. Çapraz bağlama süresinin ilaç salımına etkisi	85
3.51. Çapraz bağlama süresinin mikrokürelerin şişme derecesine etkisi.....	86
3.52. Salım ortamı pH'sının5-FU salımına etkisi	87
3.53. Salım ortamı pH'sının şişme derecesine etkisi	87
3.54. % 14 aşı yüzdeli mikrokürelerin pH=1,2 (A), pH=5,5 (B), pH=7,4 (C) 5-FU salımları	89
3.55. % 14 aşı yüzdeli mikrokürelerin pH=1,2 (A), 5,5 (B), 7,4 (C) şişme derecesine sıcaklık etkisi	90
3.56. % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (A), 5,5 (B), 7,4 (C) 5-FU salımına sıcaklık etkisi.....	92
3.57. % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (a), 5,5 (b), 7,4 (c)'de şişme derecesine sıcaklık etkisi	93

3.58. % 75 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (A), 5,5 (B), 7,4 (C)'de 5-FU salımına sıcaklık etkisi.....	95
3.59. % 75 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (a), 5,5 (b), 7,4 (c)'de şişme derecesine sıcaklık etkisi	97



ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

2.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildiği firmalar	23
2.2. Kullanılan cihazlar, markaları ve analizlerin yapıldığı yerler	24
3.1. Mikrodalga'nın aşı yüzdesine etkisi	32
3.2. Pektin, PDEAAM ve Pek-aşı-PDEAAM'nin FTIR sonuçları	34
3.3. PDEAAM ve Pek-aşı-PDEAAM'nin Raman spektrumu	36
3.4. Pektin ve farklı yüzdelerdeki aşı kopolimerlerin T_g değerleri.....	38
3.5. Pektin ve aşı kopolimerlerde mol kütlesi sonuçları.....	47
3.6. İlaçlı mikrokürelerin hazırlanma koşulları, çap ve tutuklanma verim değerleri	59
3.7. 5-FU, Kitosan, Pek-aşı-PDEAAM boş ve ilaçlı mikrokürelerinin FTIR sonuçları.....	61
3.8. İ/P oranlarının 24 saat sonunda salım oranları	78
3.9. Farklı formülasyonlarla elde edilen Pektin ve Pek-aşı-PDEAAM mikrokürelerinden 5-FU salımının kinetik parametreleri ve difüzyon katsayısı değerleri	99

KISALTMALAR

Pek	Pektin
PDEAAm	Poli(N,N-dietilakrilamid)
DEAAm	(N,N-dietilakrilamid)
CAN	Seryum Amonyum Nitrat
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
ZnCl ₂	Çinko klorür
5-FU	5-Fluorourasil
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
XRD	X Işını Kırınımı
LCST	Alt Kritik Çözelti Sıcaklığı
UCST	Üst Kritik Çözelti Sıcaklığı
UV	Ultraviyole
L	Litre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
THF	Tetrahidrofuran
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletildiamin

1. GİRİŞ

Uyarıya duyarlı polimerler, ortamdaki pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi çevresel uyarılara güçlü yapısal farklılıklarla cevap verebilen makromoleküler yapılardır [1]. Uyarıya cevap; şekil, yüzey karakteristik, çözünürlük, akışkanlık gibi özelliklerde değişim şeklinde ortaya çıkabilir. Sıcaklığa, ışığa, elektrik alana, kimyasallara ve iyonik şiddete cevap verebilen polimerler bulunmaktadır. Bu tip akıllı polimerler biyo-ayırma, ilaç salımında ve hidrofobik-hidrofilik yüzeylerde kullanılabilir [1].

Uyarıya duyarlı polimerler, mikro yapılarında hidrofillikten hidrofobikliğe ani ve tersinir geçiş yapabilirler. Bu değişimler çevresel faktörlerin küçük değişimlere uğramasıyla gerçekleşir [2]. Polimerdeki değişim, çözelti içinde çökme veya hidrojel boyutunun küçülerek absorpladığı suyu dışarı salması şeklinde makroskopik boyuttadır olabilir. Bu makroskopik değişimler tersinirdir ve dış etki kalktığında, polimer önceki durumuna geri döner. Bu değişime neden olan etkiler değişiklik gösterse de; pH değişimi, zıt yüklü diğer bir polimerin eklenmesi, elektrik alan etkisi, sıcaklık ve iyonik kuvvet değişimine bağlı olarak hidrojen bağları etkilerinin değişimi olabilir [2].

Kontrollü ilaç salım teknolojisi geleneksel tedavi yöntemleriyle karşılaştırıldığında ilacın yan etkisini azaltarak biyoaktivitesini korur ve böylece tedavinin etkisini artırır [3]. Doksorubisin ve 5-Fluorourasil gibi toksik özelliği fazla olan ilaçlar kontrollü ilaç salım teknolojisinde özel yere sahiptir [3].

Sıcaklık duyarlı polimerler, düşük sıcaklıklarda sulu çözeltilerde yüksek çözünürlüğe sahiptirler ancak belirli bir sıcaklığın üzerinde faz oluşturup çözeltilerden ayrılırlar [4]. Sulu polimer çözeltisinde faz ayrılmasının gözlenmeye başlandığı sıcaklık değeri, alt kritik çözelti sıcaklığı (lower critical solution temperature, LCST) olarak adlandırılır [4]. Birçok polimer, sulu çözeltilerde LCST göstermektedir.

Poli(N,N-dietilakrilamid) (PDEAAm), hidrofilik amid grupları ve hidrofobik dietil yan grupları içeren sıcaklık duyarlı bir polimerdir [5]. Bu karakteri, PDEAAm sulu çözeltisinin sıcaklıkla çözünme davranışının tersine dönmesine sebep olur. PDEAAm,

LCST değerinin altındaki sıcaklıklarda, hidrofilik gruplar arasında kuvvetli hidrojen bağlanmalarıyla polimerin suda iyi çözünmesi gerçekleşir. LCST değerinin üstünde ise hidrofobik gruplar etkin olur ve polimer çöker. Bu özelliğinden dolayı PDEAAm'nin sıcaklığa duyarlı polimer olarak kullanımı giderek artmaktadır [5].

Doğal kökenli olarak bilinen polimerlerden pektin, kontrollü salım sistemlerinde genel olarak kullanılan polimerik materyaller arasındadır [6]. Pektinin sulu çözeltileri, yapılarındaki serbest karboksil gruplarından dolayı asidiktir. Karboksil grupları nötralleştirilmemiş pektinin % 0,5-1'lik çözeltisinin pH değeri 3,2-3,4 arasındadır [7]. Kontrollü salım yapan sistemlerde, pektin ile etkin madde istenen doku veya organa hedeflendirilebilir [7].

5-Fluorourasil; asidik, hidrofilik karakterli, solid tümör tedavisinde kullanılan antineoplastik ajandır [8]. Kolon, mide, meme ve pankreas kanserlerinin tedavisinde kullanılan metabolizmada 10-20 dakika yarılanma ömrüne sahip kemoterapötik bir ilaçtır [9]. 5-FU'nun oral formölasyonu kanser tedavisi için oldukça iyi bir gelişmedir. Toksik bir ilaç olması sebebiyle mide-bağırsak zehirlenmelerine, şiddetli kemik ağrılarına ve kanda ağır yan etkilere neden olabilmektedir [10].

Tez alışması iki kısımdan oluşmaktadır. Çalışmanın ilk kısmında, sıcaklığa duyarlı PDEAAm ile doğal polimer pektin kopolimerinin mikrodalga destekli serbest radikalik katılma reaksiyonu ile sentezlenmesi, optimum aşılama koşullarının belirlenmesi ve kopolimerlerin yapılarının aydınlatılması hedeflenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise, sentezlenen sıcaklığa duyarlı kopolimerin mikroküre formölasyonları ile 5-FU salımı incelenmiştir. Aşı kopolimerin 5-FU yüklü mikrokürelerinin sıcaklık kontrollü salım davranışları incelenmiş ve 5-FU yüklü mikrokürelerin ilaç/polimer miktarı, çapraz bağlayıcı miktarı, çapraz bağlayıcı süresi, ve farklı sıcaklıklarda optimum salım koşulları belirlenmiştir.

1.1. Polimerlerin Genel Tanımı

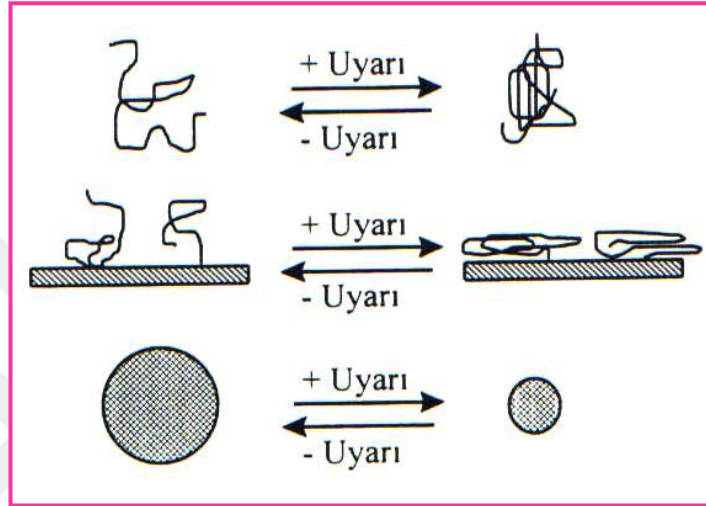
Polimerler; çok sayıda molekülün kovalent bağlarla düzenli bir şekilde bağlanarak oluşturdukları yüksek mol kütleli bileşiklerdir. Polimerler “monomer” denilen birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır [11]. Polimerlerin hafif, kolay işlenebilir, düşük yoğunluklu, dekoratif, kimyasal açıdan inert ve düşük maliyetli olmaları, esnek yapıları, korozyona uğramamaları ve kullanım amacına uygun termal ve mekanik özelliklere sahip olmaları bu ürünlerin çok yönlü kullanılmasını sağlamıştır [12]. Seçilebilecek özelliğe bağlı olarak polimerler değişik gruplar altında toplanabilirler. Polimerlerden uyarıya duyarlı olanlar sıcaklık, pH, çözücü özelliği, basınç, iyonik şiddet, elektrik alan gibi fiziksel ve kimyasal değişimlere yanıt veren polimerlerdir. Uyarıya duyarlı polimerler bu özelliklerinden dolayı akıllı polimerler olarak da adlandırılırlar [12].

1.2. Uyarıya Duyarlı Polimerler

Çevreye duyarlı veya uyarıya duyarlı olarak adlandırılan akıllı polimerler; sıcaklık, pH, çözücü özelliği, basınç, iyonik şiddet gibi fiziksel ve kimyasal değişimlere, kritik bir noktaya erişilinceye kadar, makroskopik düzeyde, çökme, faz değişimi veya reaksiyon, geçirgenlik hızında değişimler şeklinde yanıt veren polimerlerdir [13]. Bu makroskopik değişimler, uygulanan etkinin kaldırılması halinde tersinirdir. Akıllı polimerler hidrofilik yapıdan hidrofobik yapıya makro yapıda hızlı ve tersinir olarak geçiş yaparlar [13]. Biyopolimerlerdeki bu doğrusal olmayan cevaplar partiküllerdeki yüksek etkileşimlerle oluşur. Her bir monomer birimindeki partiküler etkileşim az olmasına rağmen, yüzlerce ya da binlerce monomer biriminin bir araya gelmesi ile bu etkileşimler, bütün sistemde oluşan proseslerin ilerlemesini sağlar [14].

Uyarı-cevap polimerleri, çevresel koşullarda meydana gelen küçük dış değişimler karşılığında oldukça büyük ve ani, fiziksel ve kimyasal değişimler gösterebilen polimerlerdir [15]. Bu tür polimer sistemleri, uyarıyı bir sinyal olarak kabul eder, bu sinyalin büyüklüğüne karar verir ve karşılığında zincir konformasyonlarını değiştirirler. Bu sistemlerin farklı cevaplar vermesine neden olan uyarılara bağlı olarak polimerler şu şekilde sınıflandırılırlar;

- Sıcaklık duyarlı polimerler
- pH duyarlı polimerler
- Işığa duyarlı polimerler
- Elektrik alana duyarlı polimerler
- Manyetik alana duyarlı polimerler [14, 15].



Şekil 1.1. Uyarı-cevap Polimerleri (a) Çözeltide, (b) Ara-yüzeyde ve (c) Hidrojel halinde [15].

1.3. Sıcaklığa Duyarlı Polimerler

Sıcaklık-duyarlı polimerlerde, polimer sistemini oluşturan bileşenlerden en az biri genellikle çözücü su ortamında sıcaklığa bağlı bir çözünürlüğe sahip olmalıdır. Lineer ve çapraz-bağlı ısıya duyarlı polimerler suyla tek bir faz oluştururlar; düşük sıcaklıkta şişerler ve kritik bir sıcaklığın üzerinde ayrı bir faz oluştururlar. Sudaki şişme derecesinde belirgin bir değişiklik gösteren sıcaklık duyarlı bir polimer elde etmek için, polimeri oluşturan bileşenlerin belli bir sıcaklığın altında veya üstünde çözünmemeleri gerekir. Bu sıcaklık derecesinde görülen hacim değişimi polimer zincirinin bileşenlerine ve hidrojin iyonlaşma derecesine bağlı olarak tersinirdir [16].

1.3.1. Negatif sıcaklık duyarlı polimerler

Negatif sıcaklık duyarlı polimer yapılar limit bir sıcaklık değerin üstünde çökme özelliği gösterir. Bu limit sıcaklığın üzerinde ise su ile hidrofobik özellik gösterip su moleküllerini itmektedir. Diğer bir ifade ile limit sıcaklığın altında polimerik yapı, su içinde çözünür halde iken limit sıcaklığın üzerinde su içinde çözünmez hale geçmektedir. Sıcaklık kritik bir değere ulaşıncı polimerde faz değişimi olur ve polimeri çözen bu en düşük çözücü sıcaklığına alt kritik çözünme sıcaklığı (LCST) denir [16]. Daha detaylı incelendiğinde ilaç salımı uygulamalarında kullanılan polimerler LCST değerinin altında çözünürler. LCST değeri, sıcaklığa duyarlı ve yan zincirlerinde iyonize gruplar olan polimerlerde pH'ya da bağlıdır. Ayrıca polimerin hidrofilik/hidrofobik dengesi de LCST değerini etkiler. Birçok polimerin suda çözünürlüğü sıcaklık artmasıyla artar. LCST gösteren polimerlerin sıcaklık arttıkça suda çözünürlükleri azalır. Bu özelliğe sahip polimerlerden yapılmış hidrojel LCST'nin üstünde sıcaklık artmasıyla büzüşürler. Bu özellik, kontrollü ilaç salımı ve doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır [17].

Negatif sıcaklık duyarlı polimer olarak bilinen ve üzerinde yaygın çalışmalar yapılan polimerlerin başında, N-izopropilakrilamid monomeri ile elde edilen poli(Nizopropil akrilamid) (PNIPAM) gelmektedir. PNIPAM'ın LCST değeri 32 °C'dir [18]. PNIPAM homopolimerin LCST değeri olan 32 °C'yi değiştirmek için polimer zincirine hidrofilik veya hidrofobik gruplar eklenmesi genel bir metot olarak uygulanmaktadır.

Sıcaklığa duyarlı polimerler yan gruplarındaki hidrofilik ve hidrofobik grupları bir denge içerisinde tutmaktadır. LCST'nin üzerindeki sıcaklıklarda, hidrofobik gruplar arasındaki etkileşimler baskın gelir ve polimer zincirlerinde entropinin neden olduğu çökme ve faz ayrılması gözlenir. Sıcaklık duyarlı polimerin hidrofilik içerikleri artırılır veya azaltılırsa, polimer çözeltisinin LCST değeri, sırasıyla artar veya azalır [19].

1.3.2. Pozitif sıcaklık duyarlı polimerler

Pozitif sıcaklık duyarlı polimerlerde üst kritik çözünme sıcaklık derecesi vardır (upper critical solution temperature, UCST). LCST sıcaklığına sahip polimerler, sıcaklığın

artması ile hidrofilikten hidrofobikliğe geçiş gösterirken, UCST özelliğine sahip polimerler bunun tam tersi özellik gösterir [20]. Poli(akrilikasit) ve poliakrilamid polimer yapıları pozitif sıcaklık duyarlı polimerik yapılara örnektir [21]. Polietilenglikol-b-poli D,L-laktik asit-ko-glikolik asit-b-polietilenglikol PEG-PLGA-PEG veya PLGA-PEG-PLGA dizilerinden oluşan blok polimerler, sürekli ilaç salım sistemi olarak incelenmiştir [22, 23]. Sentetik sıcaklık duyarlı polimerlerin yanı sıra xyloglukan gibi doğal sıcaklık duyarlı polimerik yapılar da mevcuttur [24].

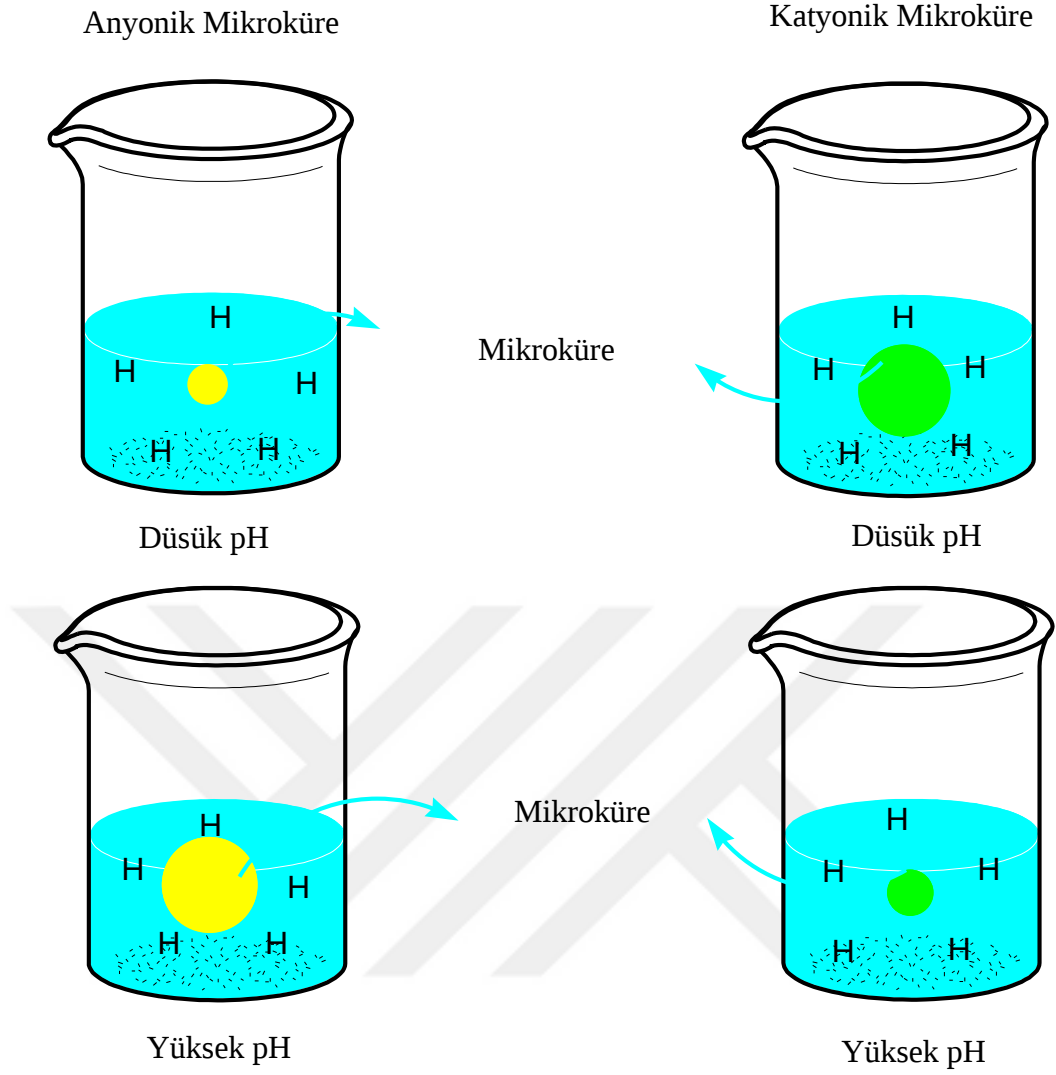
1.4. pH-Duyarlı Polimerler

Polielektrolitler su ve benzeri diğer iyonlaştırıcı çözücü içinde polimerik iyonlar oluşturabilen makromoleküllerdir. Polimer iyonlaşabilen grup içeriyorsa pH-duyarlı polimer olarak adlandırılır. İyonlaşma pH tarafından belirlenir. pH-duyarlı polimerler, pH değişimine karşı iyonlaşmayı ve bu sebeple polimerin özelliklerini değiştiren karboksilik asit ve primer aminler gibi asılı asidik/bazik gruplar veya sülfonik asit ve kuaterner amonyum tuzları gibi güçlü asit ve bazları içerirler [25]. Uygun pH ve iyonik şiddetli sulu ortamda, asılı gruplar iyonlaşır ve polimer ağında sabit yükler ortaya çıkmaya başlar. Polimer, çözücü içinde iyonlaştığında, polimer zincirindeki elektrostatik yüklerin birbirini itmesi sonucu hacimsel olarak bir genişleme meydana gelir. Diğer taraftan çözücü polimer gruplarının iyonlaşmasını engellediği durumda ise polimer kompakt bir hal alır. Eğer polimer grupları hidrofobik ise, polimer kütle halinde çökelir [25]. Hidrofobik yüzey enerjisi ve polimer zincirindeki yüklerin elektrostatik itme kuvvetleri polimerin çözücü içindeki davranışını belirler [26]. Zayıf bir elektrolitin iyonlaşma derecesi pH ile kontrol edilebilir olmasından dolayı, akıllı polimerler keskin bir şekilde ortamın pH değerine bağlı olarak fiziksel kompozisyonunu değiştirmektedir. Tüm pH duyarlı polimerler, polimer ana zincirine bağlı gruplarda, ortamın pH değerine duyarlı olarak proton yakalayan veya ortama proton salan asidik ya da bazik gruplar içerir. Polimer gruplarının zayıf asidik (anyonik) olduğu durumda; ortamın pH derecesi artırıldığında, polimerin su tutma ve hacimce genişlemesi artacaktır. Şayet polimer grupları zayıf bazik gruplar içeriyorsa, bir önceki durumun tersi olarak, pH değerinin artması ile polimer hacimce küçülecektir. Diğer bir ifadeyle; dış ortamdan gelen uyarıcıdaki değişiklik, polimerin kimyasal yapısı ve polimer ile çevresindeki moleküller arasındaki etkileşimi

değiştirecektir [27]. pH duyarlı polimerler katyonik ve anyonik olmak üzere iki ana grupta toplanabilir.

Katyonik polimerler karın bölgesinin düşük pH ortamında ilaç salımı yaparlar. Gupta ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; glisin, gluteralaldehit ve kitosandan oluşan çapraz bağlı mikroküreler elde etmiş ve küresel yapıların su tutma özelliğini, farklı pH değerlerinde zamana karşı takip etmiştir. İlaç salım denemeleri, model ilaç olarak thiaminhidroklorür kullanılarak yapılmış ve kitosan mikrokürelerin, ilaç salım sistemi olarak kullanılmasına imkân tanıyan, pH değişimine duyarlı salım yaptığı tespit edilmiştir [28].

Anyonik polimer örneği kalsiyum-aljinat veya yeni geliştirilen kalsiyum pektinat sistemleri mide ve kolon bölgesinde ilaç salım sistemi olarak incelenmiştir [29]. İlaç salımı geniş pH aralığında araştırılmış ve hızlıdan yavaş uygulamaya formülasyona bağlı olarak kontrol edilebilir ilaç salımı gözlenmiştir [29].



Şekil 1.2. pH'ya karşı duyarlı anyonik ve katyonik mikroküre davranışları

1.5. Işık Duyarlı Polimerler

Bu tür polimerler yapılarında, yan veya ana zincire bağlanmış durumda ya da polimer ile fiziksel karışım halinde bulunurlar [30]. Ayrıca polimerik yapıda çapraz bağ oluşturmuş fotokromik maddeler içerirler. Bu maddeler, ışığa karşı fonksiyonel özellik gösterebilen gruplardan oluşmuş olup, ışık ile etkileşimleri sonucu tersinir yapısal değişiklikler gösterirler [31]. Bu tür maddelere örnek olarak, azobenzen, spiropiran ve trifenil metan verilebilir. Fomina ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kuinon methid zinciri üzerine ışık ile ayrışabilen nitrobenzil koruyucu grupları yerleştirmiştir. Araştırmada, mikrokapsüllerden UV uygulanmadığı durumda minimum seviyede

salım olmasına karşın, 350 nm dalgaboyunda UV ışık uygulandığında kapsül içinde bulunan boyanın tamamen salım yaptığı rapor edilmiştir [32].

1.6. Elektrik Alana Duyarlı Polimerler

Elektrik duyarlı polimerik yapılar, polimer ana zinciri üzerinde iyonlaşabilen gruplar taşıyan polimerlerdir. Bir elektriksel alan uygulandığında bu tür polimerler genellikle çökerler [33]. Akıllı polimerlerin çökme davranışları elektrik alan kontrolünde de gerçekleşebilir. Bu tür polimerler membran şeklinde gözenekli hazırlanırlar. Polimer şiştiğinde gözenekler açılır ve içerdeki moleküllerin dışarı çıkmasına izin verir. Bu tür sistemlerde molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak da mümkündür. Elektriksel alandaki değişime cevap olarak sıvı kristali polimerlerde optik özellik değişimi gözlenmiştir [33].

Elektrik duyarlı materyal olarak hem doğal hem de sentetik maddeler kullanılmıştır. Doğal elektrik duyarlı materyallere örnek olarak hiyaluronik asit, kondroitin sülfat, agaroz, ksantan reçinesi ve kasiyum aljinat sayılabilir [34]. Sentetik elektrik duyarlı materyaller ise çoğunlukla metakrilat ve akrilat türevi olan materyallerdir. Bu materyallere örnek olarak kısmi hidroliz olabilen poliakrilamid, polidimetilaminopropil akrilamid ve benzerleri sayılabilir [34].

1.7. Manyetik Alana Duyarlı Polimerler

Manyetizma, canlı organizmalar üzerinde önemli bir etkidir. Kandaki hemoglobin, demir içeren bir proteindir ve manyetik özelliktedir. Dünyanın manyetik alanına uyumlu olan manyetotik bakteriler bilinen ilk canlı organizmalardır [35]. Bu bakteriler değişik şekillerde manyetik parçacıklar taşımaktadırlar. Son zamanlara yapılan araştırmalarda hayvanlarda ve insanlarda manyetik reseptör işlevi gören manyetik parçacıklar olduğuna dair sağlam bulgular vardır [36]. Manyetik parçacıklar insan sağlığı ve biyolojik uygulamalarda önemli rol oynamaktadır. Hücre ayrılması gen/ilaç taşınımı ve kanser tedavisi gibi karmaşık işlemlerin yapılmasında parçacık ve manyetizmanın birleştirilmesi son derece kullanışlıdır [37, 38]. Fe_3O_4 gibi manyetik alan duyarlı polimerler kullanılmaktadır.

1.8. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

İlaç ile ilgili araştırmalarda, hastalıkların tedavisi için yeni moleküller geliştirmek kadar bu ilaçların hastalara verilmiş şekilleri de önemlidir. Son yıllarda ilaç dozunu minimuma indirmek, dozlama periyodunu uzatmak, hastanın yan etkilerden etkilenmemesini sağlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların başında kontrollü ilaç salım sistemleri gelmektedir [39]. Kontrollü salım sistemleri, ilaçları istenilen dozlama aralıklarında hedef dokuya vermeye dayanan etkin bir tedavi yöntemi sunmaktadır [40].

İlaç kana karıştıktan sonra, kandaki etken madde seviyesi etkili olduğu plazma aralığında (terapötik pencere) kalmalıdır. Geleneksel yöntemlerde, ilaç belli aralıklarda tablet ya da kapsül şeklinde oral yolla alınır veya enjeksiyon yoluyla doğrudan kana verilir. Bu tarz yöntemlerde minimum etkili derişim (MED) ile minimum toksik derişim (MTD) değerleri arasında dalgalanmalar oluşmaktadır. Her çıkış–inişten sonra, tekrar yüksek dozda ilaç almak gerekmektedir (Şekil 1.3). Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ise ilacın terapötik pencere aralığında uzun bir periyot boyunca salımı gerçekleşebilmektedir [40].

1.8.1. Salım Mekanizmasına Göre Kontrollü Salım Sistemleri

İlaçların polimer sistemlerinden salımı için dört genel yöntem bulunmaktadır [39]:

1. Difüzyon kontrollü sistemler

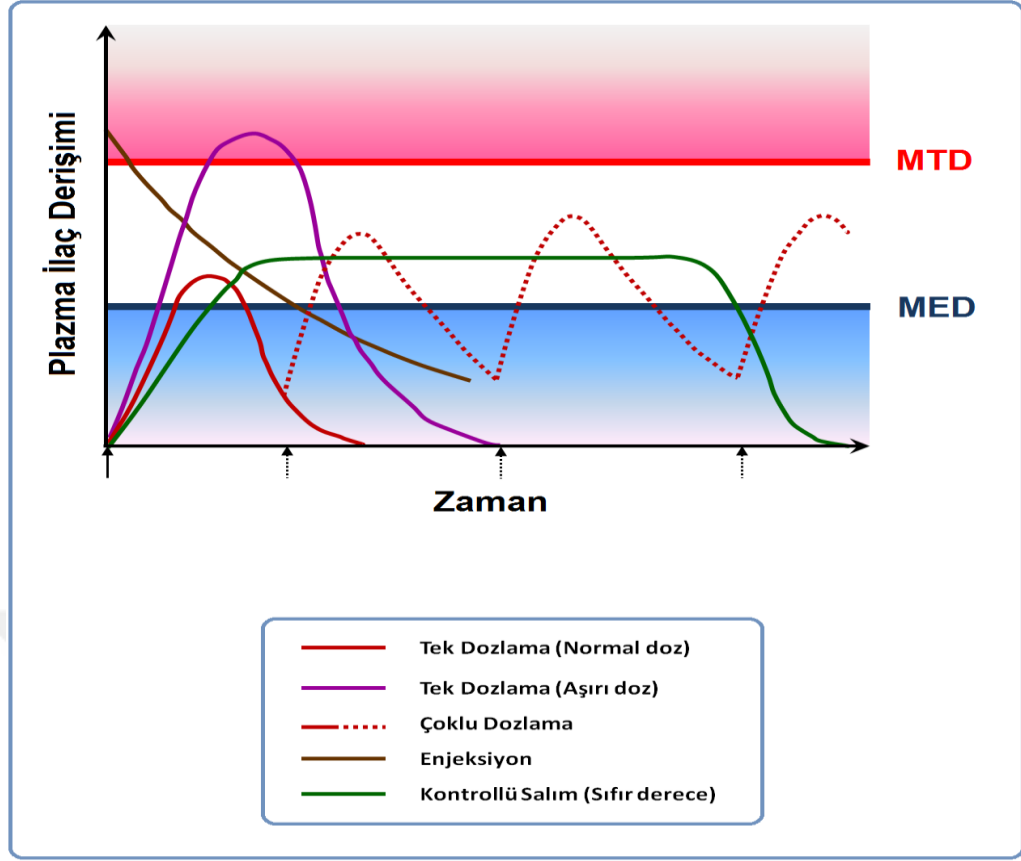
- a. Rezervuar (zarlı) sistemler
- b. Matriks (monolitik) sistemler

2. Kimyasal kontrollü sistemler

- a. Biyobozunur sistemler
- b. Zincire takılı sistemler

3. Şişme kontrollü sistemler

4. Ayarlanmış sistemler



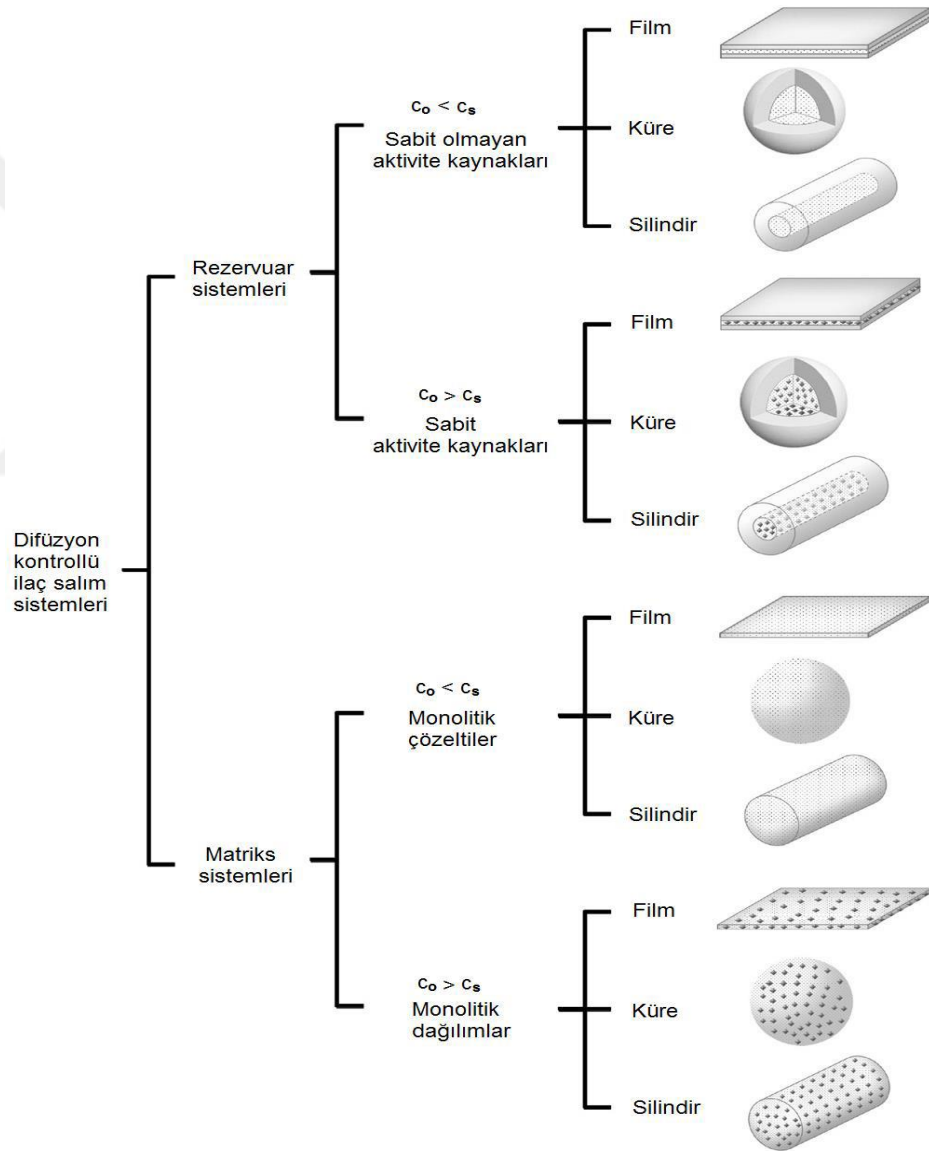
Şekil 1.3. Plazmadaki ilaç derişiminin zamanla değişimi (MED: Minimum Etkili Derişim; MTD: Minimum Toksik Derişim) [40]

1.8.1.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler

Difüzyon, ilaç salımını kontrol etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir. Elde edilen salım kinetikleri dozaj formunun boyutuna ve şekline bağlıdır. Sistemin boyutlarının ve geometrisinin ayarlanması ile istenen salım profilleri elde edilebilir [41].

Difüzyon kontrollü sistemler, rezervuar (zarlı) ve matriks (monolitik) olmak üzere iki grupta incelenebilir. Rezervuar sistemlerde ilaç polimerik bir zarla çevrili konumdadır. Bu sistemlerde ilaç salımı zardan difüzyonla gerçekleşir. Bu sebeple ilacın difüzyon hızı zarın türü ve kalınlığı ile kontrol edilir [42]. İlaç parçacıklarının çevrelemesi gereken difüzyonun mesafesi ile salım sabit tutulur. Böylelikle rezervuar sistemlerde salım sıfırıncı derece salım kinetiğiyle gerçekleşir. Bir diğer difüzyon kontrollü sistem olan matriks (monolitik) sistemlerde ilaç polimer içinde çözünmüş veya dağılmış

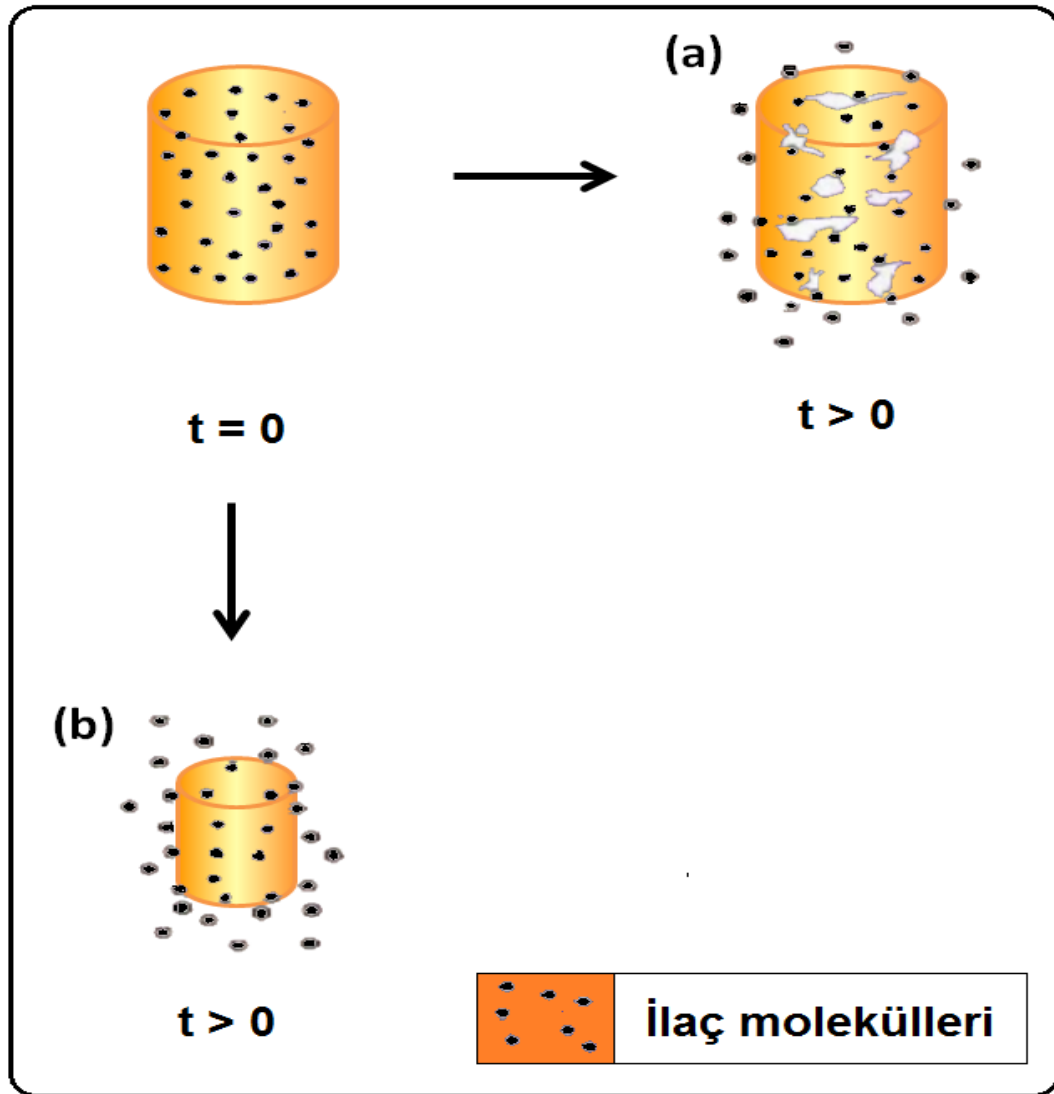
şekildedir. Hazırlanması rezervuar sistemlere göre daha kolay olan matriks sistemlerinde en büyük dezavantaj ilacın salım hızının zamanla azalmasıdır (birinci dereceden salım davranışı). Bunun sebebi salım devam ettikçe artan difüzyon mesafesidir [43]. Şekil 1.4’de (i) sistemin iç yapısına göre; (ii) (ilaç çözünürlüğüyle bağlantılı olarak) başlangıç ilaç içeriğine göre; (iii) geometrik yapıya göre difüzyon kontrollü ilaç salım sistemleri sınıflandırılmıştır. Küçük noktacıklar çözünmüş ilaç moleküllerini gösterirken, büyük noktalar çözünmemiş ilaç parçacıklarını temsil ediyor [44].



Şekil 1.4. Difüzyon kontrollü ilaç salım sistemlerinin sınıflandırılması (C_o başlangıç ilaç derişimi; C_s ilaç çözünürlüğü) [44]

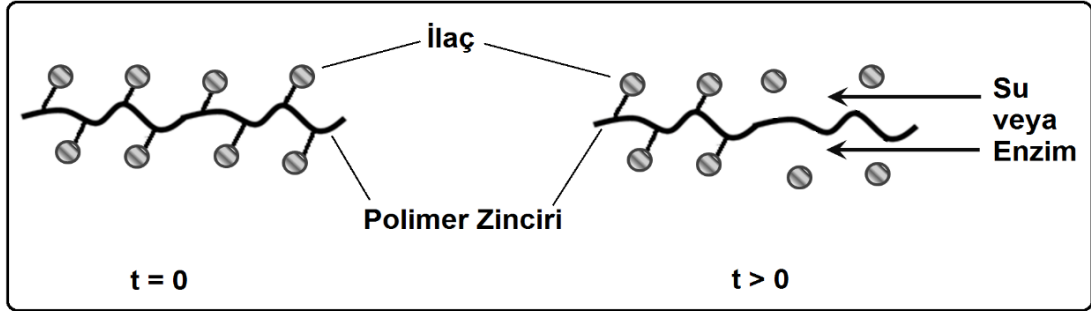
1.8.1.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler

Kimyasal kontrollü sistemler biyobozunur sistemler ve zincire takılı sistemler olmak üzere temel olarak ikiye ayrılırlar. Biyobozunur sistemlerde, asit veya baz hidrolizi, enzimatik etki veya oksidasyon ile polimer zamanla aşınır. Polimer aşındıkça, ilaç salımı gerçekleşir. Bu sistemlerde polimerin zamanla aşınması sebebiyle cerrahi müdahaleye gerek kalmadan vücuttan atılması bir avantajdır. Ancak parçalanma ürünleri toksik veya kanserojen madde içermemelidir [43].



Şekil 1.5. Biyobozunur sistemden ilaç salımı ((a) yığın erozyonu, (b) yüzey erozyonu) [43]

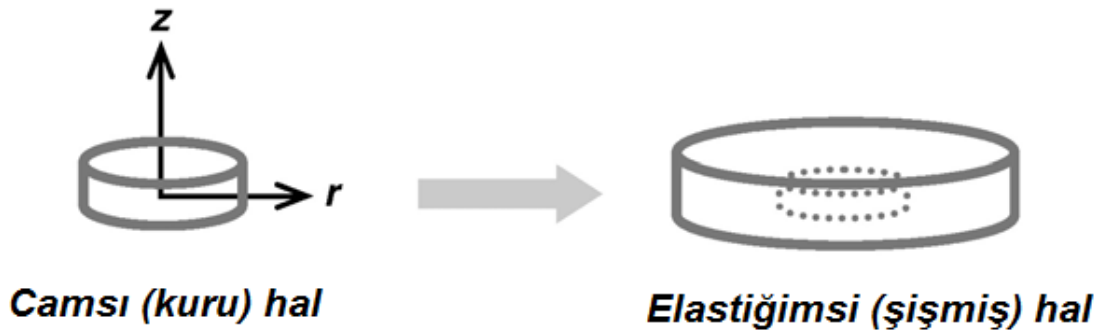
Zincire takılı sistemlerde, ilaç polimer ağına parçalanabilir kovalent bağlarla bağlıdır. Bağların parçalanması hidrolitik veya enzimatik yolla olur ve ilaç salımı bu kovalent bağların parçalanma hızı ile kontrol edilir [45].



Şekil 1.6. Zincire takılı sistemden ilaç salımı [45]

1.8.1.3. Şişme Kontrollü Sistemler

Şişebilen polimerlerden ilaç salımı, çözücünün polimer matriksine girmesi sonucu polimerin camsı-elastiğimsi geçişi esasına dayanır [46]. Çözücü, polimer yapısına girdiği anda polimer şişerek camsı haldeki polimerik yapı elastiğimsi hale geçer ve ilaç salımı başlar.



Şekil 1.7. Hidrojel tabletin camsı ve elastiğimsi halleri [46]

1.9. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Uygulama Yolları

İlacın moleküler yapısına, salım sisteminin yöntemine, dozlama aralığına, maliyete ve hastanın durumuna göre çok çeşitli kontrollü salım uygulamaları bulunmaktadır [47]. İlacın veriliş yolu terapötik sonucu doğrudan etkilemektedir.

Oral Yol: Ağızdan yutma şeklinde alınan ilaç sistemleri en sık kullanılan sistemlerdir [48]. Midenin asidik ortamında çözünmeden ince bağırsağa ulaşabilen ve burada yüksek pH ortamında çözünen emülsiyonlar, süspansiyonlar ya da kaplamalar gibi ilaç taşıma sistemleri bulunmaktadır [48].

Parenteral Yol: Ağızdan kullanımın daha uygun bir yol olacağının bilinmesine rağmen protein ve peptit gibi büyük moleküller içeren ilaçların oral yolla taşınımı henüz çözülememiş bir problemdir [49]. En önemli sorun, proteinlerin midedeki gastrik enzimler ve ince bağırsaktaki pankreatik enzimler tarafından sindirilmesidir. Bu tür ilaçlar genelde damar içi (intravenöz, i.v.), deri altı (subkütan, s.c.), kas içi (intramusküler, i.m.) ve karıncık içi (intraventriküler) yollarla kullanılmaktadır [49].

Transdermal Yol: Bazı ilaçların oral yolla emilimi düşüktür veya mide-bağırsak kanalında tahriş edici davranış gösterirler [50]. Cildin kolayca erişilebilir ve geniş bir yüzey alanına sahip olması, bu tür ilaçların taşınımında etkili bir yöntem olmuştur. Transdermal yolda lipofilik ilaçlar ölü hücrelerden oluşan korun tabakasını geçerek ilerler [50].

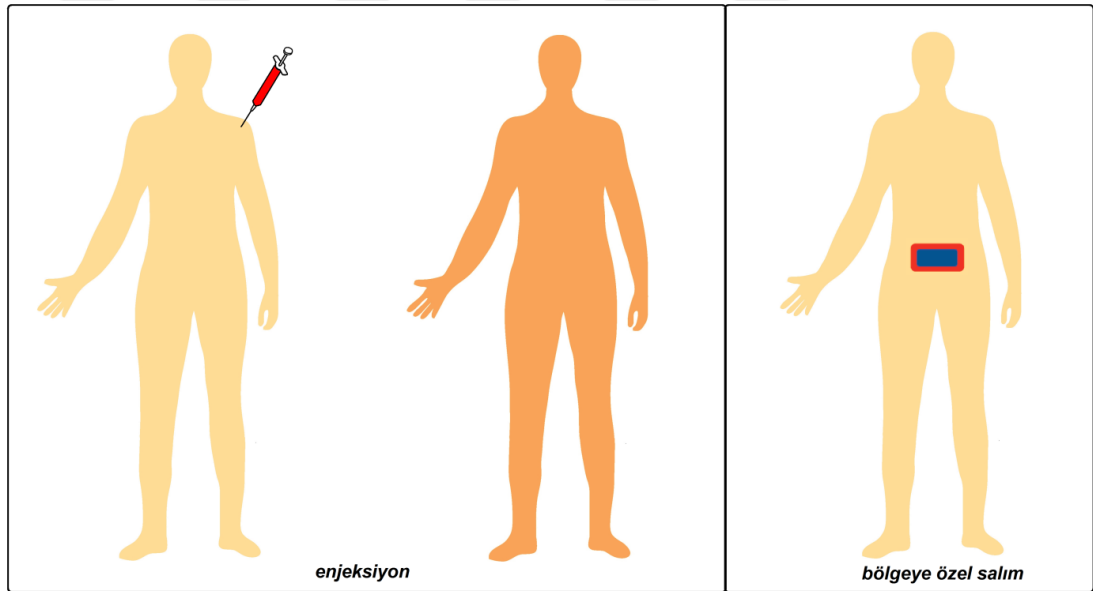
Pulmoner Yol: Pulmoner yol ile ilaç verilişi, parenteral ve oral yola alternatif olması nedeniyle son zamanlarda oldukça önem kazanmıştır. Pulmoner yolla ilaç verilişi, akciğerlerin düşük enzimatik aktiviteye, yüksek damarlanmaya, ince alveoler epitelyuma (0,1-0,2 μm), geniş yüzey alanına (100 m^2) sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir [50].

Rektal Yol: Anüs yoluyla kalın bağırsağın en alt bölgesine uygulanan bir sistemdir.

Oküler Yol: Polimerik sistemin gözün kenarına veya korneası üzerine yerleştirilmesi şeklinde uygulanan bir sistemdir. Oküler kontrollü salım sistemlerinde nanopartiküller, nanomiseller, lipozomlar ve mikroemülsiyonlar gibi çok çeşitli dozaj

formları kullanılabilir [51]. Bu sistemin en önemli avantajı ilacın uzun süre kontrollü bir şekilde verilerek bölgesel etki sağlanabilmesidir.

İmplant Sistemler: Gelişen teknoloji ile tıp alanında artan beklentiler doğrultusunda uzun süreli bölgesel, sistemik etki veya tedavi istenen uygulamalarda, dozaj formlarının kontrollü salım sağlayan sistemler olarak, özellikle de implant formunda tasarlanması önem kazanmıştır [52]. İmplant olarak tasarlanma ile karaciğerden ilk geçiş etkisine uğrayan etkin maddelerin kaybının önlenmesi, yan etkilerinin azaltılması oral yolla verilşte karşılaşılan gastrointestinal sistemden etkilenme gibi avantajlar bulunmaktadır [52]. Burada sınırlı bir süre tutulabilmeden kaynaklanan, klasik dozaj formlarının neden olduğu kan seviyelerindeki dalgalanmalar ve buna bağlı dezavantajlar da giderilmiş olmaktadır.



Şekil 1.8. Enjeksiyonda ilaç bütün vücuda yayılırken, bölgeye özel salımda yalnızca hedeflenmiş bölgede salım meydana gelir [51]

1.10. İlaç Salım Kinetiği

Çözünme hızının kontrol edilebilmesi, etken madde salım mekanizmalarının yorumlanması ve farklı formülasyonlar arasında karşılaştırma parametrelerinin elde edilmesi için çözünme hızı verilerine çeşitli matematiksel modeller uygulanmaktadır.

Bu modellerin birçoğuna Fick'in difüzyon yasasına ait eşitliklerin çözümlenmesiyle ulaşılır. İlaç salım kinetiği polimerin şişmesi, polimer erozyonu, ilaç çözünme/difüzyon karakteristikleri, matris içinde ilacın dağılımı, ilaç/polimer oranı ve sistem geometrisi (silindir, küre vb.) gibi birçok faktörden etkilenir [53].

Sıfırıncı Derece Kinetik: Kontrollü etkin madde salımının sağlanması için biyobozunur polimerlerin kullanılmasıyla hazırlanmış mikropartiküler sistemlerde amaç sıfırıncı derece kinetik ile etkin madde salımının sağlanmasıdır [54]. Matematiksel olarak sıfırıncı derece salıma ait hız ifadesi aşağıdaki eşitlikte verilmektedir.

$$-\frac{dC}{dt} = k_o$$

Bu eşitliğin $0 \rightarrow \infty$ 'a giderken integrali alındığında, aşağıdaki eşitlik elde edilmektedir.

$$C = C_o - k_o t$$

C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı,

C_o : Başlangıçtaki etkin madde miktarı,

k_o : Sıfırıncı derece salım hız sabiti,

t : Zaman

Birinci derece kinetik: Bu kinetige göre hız ifadesi şu şekilde verilmektedir.

$$-\frac{dC}{dt} = kC$$

Bu ifadenin integrali alındığı zaman aşağıdaki eşitlik elde edilmektedir.

$$\ln C_t = \ln C_o - k_1 t$$

C_t: t süre sonunda çözünmeden kalan etken madde miktarı

C_o: Başlangıçtaki etken madde miktarı

k₁: Birinci derece çözünme hız sabiti

lnC değerleri t'ye karşı grafiğe geçirildiğinde eğimi k₁ olan bir doğru elde edilir. Bu salım kinetiğine göre zamana karşı çözeltiye geçen etken madde miktarı üssel olarak azalmaktadır. Klasik ilaç şekillerinin çoğu ve uzatılmış etkili salım yapan sistemler bu tür salım kinetiğine uymaktadırlar.

Peppas eşitliği: İlacın salımı gerçekleşmeden önce etken madde polimer içerisinde dağıtılmış ya da çözünmüş olarak bulunmaktadır. İlaç katı polimerden dışarı difzlenemez. Ancak zc molekülleri polimerik matrikse girince polimer şişer ve şişen polimer ilacın difüzyonuna izin verir. Camsı bir polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde olusan ilaç salımı Peppas tarafından deneysel olarak aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir [54].

$$M_t/M_\infty = kt^n$$

Eşitliğin logaritmik şekli ise;

$$\log(M_t/M_\infty) = \log k + n \log t$$

M_t: t zamanında salınan etkin madde miktarı

M_∞: ∞ zamanda salınacak etkin madde miktarı

k: Salım hız sabiti

n: Salım mekanizmasını belirleyen difüzyonel sabit

Bu eşitlik camsı polimerlerde Fick yasasına uymayan taşınma (Durum II taşınma) ve Fick yasalarına göre difüzyonla salım mekanizmalarının birleştirilmiş halidir. Ayrıca yine bu eşitlik etken madde salımının %60'lık ilk kesri için geçerlidir. Eşitliklerden görüldüğü üzere n=1 olması durumunda ilacın salım hızı zamandan bağımsızdır. Bu durum sıfırıncı derece kinetiğe uygundur. Çizelge 1.1'de n sabitinin ince polimerik film sistemleri için alabileceği değerler ve bunlarla ilgili salım mekanizmaları gösterilmiştir [54]. Mikrokürelerden ilaç salımı aynı zamanda difüzyon katsayısı (D) değerlerinin hesaplanmasıyla desteklenmiştir.

$$D = \left(\frac{r\theta}{6M_\infty} \right)^2 \pi$$

Burada Θ , $M_t/M_\infty - \sqrt{t}$ grafiğın eğimi, r mikrokürelerin yarıçapları, M_∞ ise mikrokürelerdeki salınabilecek maksimum ilaç miktarıdır.

Çizelge 1. 1. Polimerik küre sistemleri için salım mekanizmasını belirleyen difüzyonel sabit (n) değerleri

n değeri	İlaç Taşınma Mekanizması
0,43	Fick Difüzyonu (Durum I)
$0,43 < n < 0,85$	Fick Yasasına Uymayan (anormal geçiş)
0,85	Durum (II)
$n > 1,0$	Özel Durum (II)

1.11. Mikroküreler

Çapları birkaç μm 'den 1 mm'ye kadar değişebilen, düzenli yapıda, mikro taşıyıcılardır [55]. Mikroküreler; etkin maddeyi kontrollü veya modifiye bir şekilde salması, etkin maddenin yapı ve aktivitesini değiştirmemesi, etkin maddenin lokal irritasyon riskini azaltması, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda dayanıklı olması, düşük dozda ilaç kullanımına olanak sağlaması ve düşük doza bağlı olarak toksisiteyi azaltması, biyolojik sistemle uyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gibi özellikleri ile diğer partiküler sistemlerden ayrılmaktadır [55, 56].

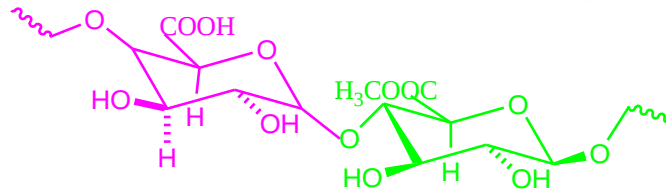
Tıptaki en önemli kullanım alanlarından biri de, kontrollü ilaç salımıdır. Burada önemli olan, ilaçların gerekli organlara istenilen dozlarda ve belli sürede verilmesidir.

Son yıllarda ilaçları sabit hızda salmak için polimerik yapılar kullanılmaktadır. Akıllı jeller, bu sistemlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu jeller, vücut içindeki şartlara duyarlı olduklarından, ilacın salım hızını değiştirerek kandaki ilaç seviyesini uygun düzeyde tutabilecek özelliklere sahiptirler. Sıcaklığa duyarlı jellerin kullanımıyla, ilaç molekülleri jel örgüsünde hapsedilebilir ve sıcaklıktaki değişime uygun olarak ortama salınabilir [57].

1.12. Çalışmada Kullanılan Polimerler ve İlaçlar

1.12.1. Pektin

Pektin, metanolle kısmi olarak esterleşmiş, α -(1-4) bağlı, D-poligalakturonik asit birimlerinden oluşmuş, doğrusal bir polimerdir. Ayrıca pektinde D-galaktoz, L-arabinoz, L-ramnoz yapıları bulunur [58]. Pektinleri tanımlamak gerekirse, uygun koşullar altında, şeker ve asitlerle jel oluşturabilme özelliğine, ayrıca farklı derecede de nötralizasyon derecesine sahip, suda çözünebilen pektik asitler için kullanılır. Bu tanım düşük metoksilli pektinleri ve özellikleri değiştirilmiş pektinleri kapsar [59]. Pektik asit terimi çoğunlukla kolloidal poligalaktronik asitlerden oluşan pektik maddeler için kullanılır [60]. Pektinik asitler terimi ise ihmal edilebilir oranda metil ester grupları içeren kolloidal ve doğrusal olan poligalaktronik asitler için kullanılır. Bu asitler, uygun koşullar altında, şeker ve asitlerle veya uygun derecede düşük metoksil grubu varlığında metal iyonlarıyla jel oluştururlar [61]. Pektinler üzerine etkili iki enzim vardır. Bunlardan esteraz olan pektaz, metil esterini hidroliz ederken, bir hidrolaz olan pektinaz ise, galaktronik asitler arasındaki α -(1-4) bağlarını açar. Ayrıca pektin, bağırsaktaki bakterilerin etkisiyle parçalanabilir.

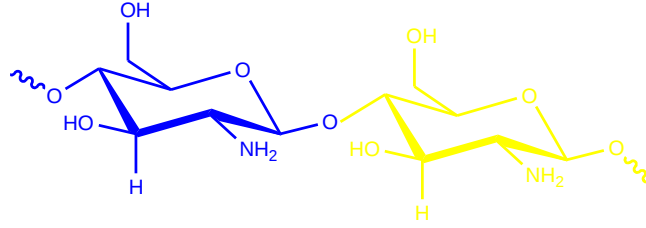


Şekil 1.9. Pektinin yapısı

1.12.2. Kitosan

Kitin, poli- β -(1-4)N-asetil-D-glukozamin yapısında olan, yapısı selüloza benzeyen ve selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci yenilebilir biyopolimerdir [62]. Kitosan, kitinin alkalın deasetilasyonu ile elde edilen amorf yapıda bir poliaminosakkarit ve doğal olarak meydana gelebilen birkaç katyonik polielektrolitten biridir [63]. Kitosanın kimyasal yapısı, poli- $[\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi- β -D-

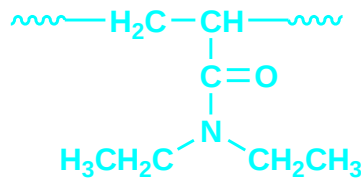
glukopiranoz] şeklindedir. Kitinde asetamid ($-\text{NHCOCH}_3$), kitosanda ise amin ($-\text{NH}_2$) grubu bulunmaktadır. Kitosanın yapısal formülü Şekil 1.10’da gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Kitosanın yapısal formülü

1.12.3. Poli (N,N-dietilakrilamid) (PDEAAm)

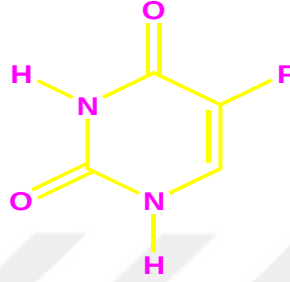
Poli(N,N-dietilakrilamid) sıcaklığa duyarlı olan hidrofilik amid grupları ve hidrofobik dietil yan gruplara sahip bir polimerdir [64]. Bu grupların sıcaklığa duyarlılıkları polimerin yapısındaki hidrofilik/hidrofobik grupları arasındaki hassas denge sayesinde. Sıcaklığa duyarlı polimerler LCST ya da UCST değerlerine sahiptir. Düşük sıcaklıklarda polimer yapısındaki hidrofilik grupların kendilerini çevreleyen su molekülleri ile güçlü hidrojen bağları oluşturmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla hidrofobik etkileşimler ile hidrojen bağlarını kırılacak ve polimerik yapıda çökme gerçekleşecektir [65]. Şekil 1.11’de poli(N,N-dietilakrilamid)’in kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Poli(N,N-dietilakrilamid)’in kimyasal yapısı

1.12.4. 5-Fluorourasil (5-FU)

5-Fluorourasil ($C_4H_3FN_2O_2$, IUPAC ismi 5-floro-1H-pirimidin-2,4-dion) molekülü en eski kemoterapi ilaçlarından biridir. Urasilin C-5 formülasyonundaki hidrojenin yerinde flor olan beyaz kristalin bir ilaçtır. Şekil 1.12’ de 5-FU’nun kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1.12. 5-Fluorourasil’in kimyasal yapısı

5-Fluorourasil; asidik ($pK_a=7,98$), hidrofilik karakterli, erime noktası ($282-283\text{ }^{\circ}\text{C}$) yüksek ve solid tümör tedavisinde kullanılan antineoplastik ajandır [66]. Kolon, mide, meme ve pankreas kanserlerinin tedavisinde kullanılan metabolizmada kısa yarılanma ömrüne (10-20 dk) sahip kemoterapötik bir ilaçtır [67].

5-Fluorourasil, DNA replikasyonunda deoksiribonükleotidler için gerekli olan timidilat sentaz aktivitesini inhibe ederek timidini tüketir ve DNA’ da deoksiüridin trifosfatla birleşerek hücre ölümüne neden olur. Böylece DNA sentezi bozulur. Ayrıca RNA’ da üridin trifosfatla birleşerek sitotik etki ile RNA sentezi ve işleyişini bozar [68].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 2.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildiği firmalar

No	Kimyasal Maddeler	Firma
1	Kitosan (Orta moleküler ağırlıkta, %1’lik çözeltisinin 25 °C’deki viskozitesi 200-800 cP) Pektin (% 55-70 esterlenmiş) N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED) Tetrahidrofuran (THF) Etil alkol 5-Fluorourasil Seryum amonyum nitrat Di sodium mono hidrojen fosfat Mono sodyum dihidrojen fosfat	Sigma Aldrich
2	(N,N-dietilakrilamid)	TCI
3	Çinko klorür ($ZnCl_2$) Sodyumhidroksit (NaOH) Asetik asit (%100’lük)	Merck

2.2. Cihazlar

Çizelge 2.2’de deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların markaları/modelleri ve analizlerin yapıldığı yerler belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan cihazlar, markaları ve analizlerin yapıldığı yerler

No	Cihaz Adı	Marka, Model	Analizin yapıldığı yer
1	FTIR Spektrofotometresi	Bruker Vertex 70v, USA	Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı
2	Termogravimetrik Analiz (TGA)	TA TGA Q 500, USA	Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı
3	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	TA DSC Q 2000, USA	Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı
4	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Jeol, JSM 5600, JAP	Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı
5	Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	Veeco, Multi Mode V, USA	ODTÜ Merkez Laboratuvarı
6	X-Işını Difraksiyonu (XRD)	Rigaku, Ultima IV, USA	ODTÜ Merkez Laboratuvarı

Yukarıdaki temel cihazlara ek olarak aşağıdaki cihazlarda kullanılmıştır;

- UV spektrofotometresi (Perkin Elmer Lambda 35, USA)
- Çalkalamalı su banyosu (Medline BS-21)
- Isıtmalı su banyosu (Nüve SI 402)
- Manyetik karıştırıcı (Corning PC-420)
- pH metre (Hanna instruments HI 221)
- Vakum etüvü (VacuCell VUS-B2V)
- Analitik terazi (Pioneer PA214C)
- Mikrodalga fırın (Milestone, Stars)

2.3. Mikrodalga Destekli Pek-aşı-PDEAAm Sentezi

Aşılama işlemi azot gazı atmosferinde, üç boyunlu balonda, geri soğutucu altında su banyosunda ve mikrodalga fırında gerçekleştirilmiştir. Pektin çözeltisi saf su içerisinde (% 2), oda sıcaklığında 1 gün karıştırılarak elde edilmiştir. Çözeltiye gerekli

miktarda destillenmiş N,N-dietilakrilamid ilave edilerek 25 °C’de 30 dakika süreyle azot gazı geçirilmiş ve daha sonra karışıma seryum amonyum nitrat/HNO₃ (CAN) başlatıcısı ve TEMED ilave edilerek tepkime başlatılmıştır (Şekil 2.1). Tepkime süresince ortamdan azot gazı geçirilmeye devam edilmiştir. Aşılama tepkimesi çeşitli sürelerde (1-6 saat) gerçekleştirilmiştir. Polimerleşme sonunda ortama doymuş hidrokinon çözeltisi ilave edilerek tepkime durdurulmuştur. Oluşan ürünler etanolde çöktürülerek ve süzülerek elde edilen ürün, homopolimerin uzaklaştırılması amacıyla soksalet içerisinde THF ile 48 saat yıkanmıştır. Homopolimeri uzaklaştırılan aşı kopolimer 40 °C’de vakum etüvünde sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Optimum çalışma koşullarını belirlemek için aşılama süresinin, sıcaklığın, mikrodalga gücünün, monomer, başlatıcı, TEMED, HNO₃, polimer derişimlerinin ve UV ışını etkisi incelenmiştir. Aşı yüzdesi ve verimi aşağıda belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

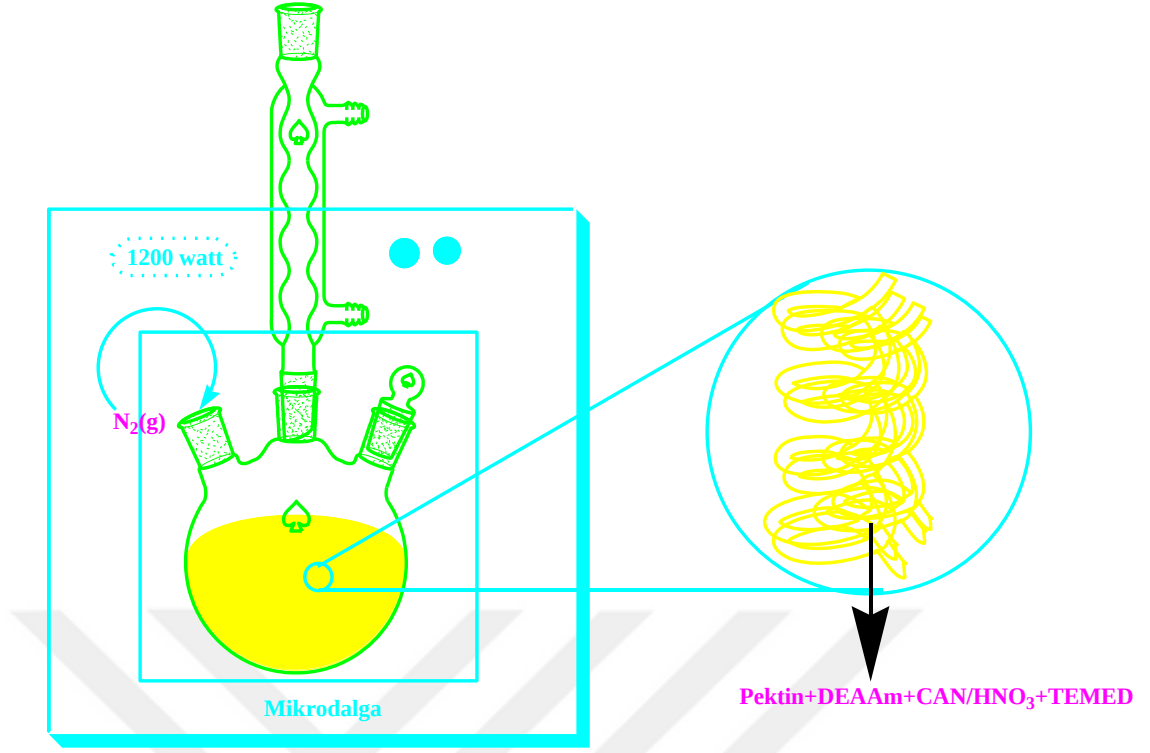
$$\% \text{Aşılama verimi} = \frac{m_c - m_p}{(m_c - m_p) + m_h} \times 100$$

$$\text{Aşı yüzdesi} = \frac{m_c - m_p}{m_p} \times 100$$

m_c : Kopolimer kütlesi

m_p : Polimer kütlesi

m_h : Homopolimer kütlesi



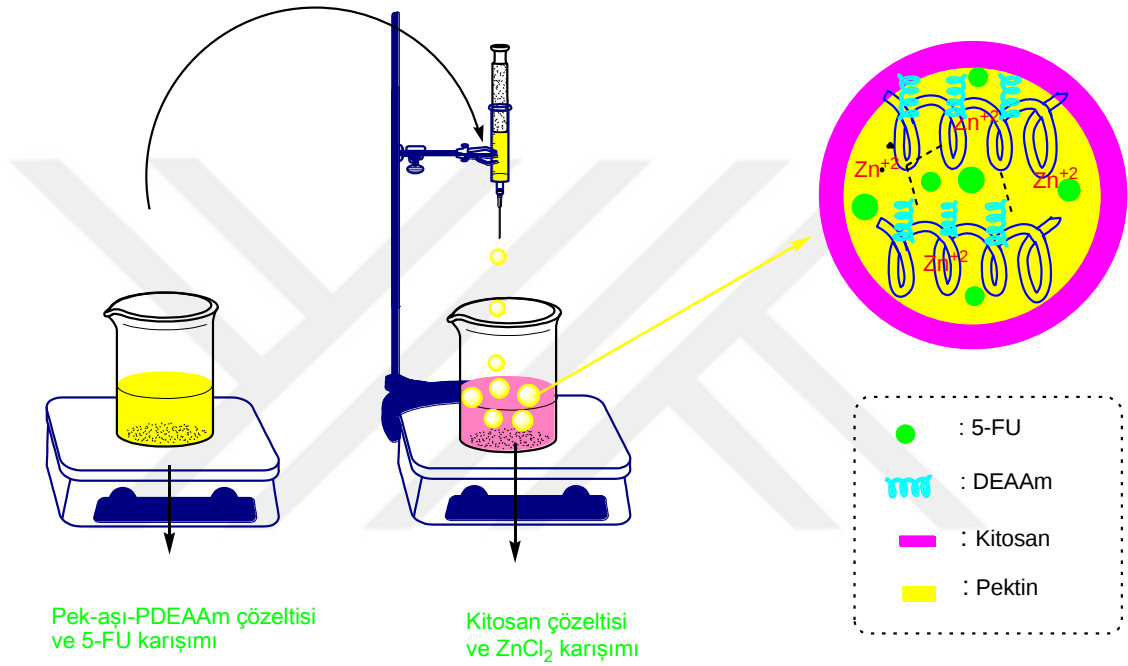
Şekil 2.1. Pek-aşı-PDEAAm aşı kopolimerinin oluşum şeması

2.4. Oral Uygulama İçin İlaç Yüklü Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerin Hazırlanması

Pektin ve aşı kopolimerlerden salım ortam koşullarına dayanabilecek mikrokürelerin oluşturulmasında kitosanla kaplama metodu kullanılmıştır. Oldukça hidrofil karakterli 5-FU in tutuklanma veriminin de artırılması için mikroküre oluşum aşamasında kaplanması tercih edilmiştir. Bu metotta pektin ve farklı koşullardaki aşı kopolimerler çözeltileri 0,1 N NaOH ile karıştırılmış ve 0,5 M kitosan içeren 0,5 M $ZnCl_2$ çapraz bağlayıcısına damlatılarak belirli sürelerde olgunlaştırılmıştır. Çeşitli mikroküre formülasyonları için farklı ilaç/polimer (i/p) oranlarında 5-FU, 10 mL pektin ve çeşitli verimlerdeki kopolimerler üzerine eklenerek 5 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Hazırlanan karışım damla damla 280 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karışan çapraz bağlayıcı içerisine damlatılarak mikroküreler elde edilmiştir. Ayrıca damlatma sırasında mikroküre boyutlarının aynı olması için 5 cm yükseklikten çapraz bağlama

çözeltisi içerisine damlatılmıştır. Karışımın son damlasının düşmesinden sonra mikroküreler çapraz bağlama çözeltisi içerisinde farklı sürelerde olgunlaştırılmıştır. Bu süreler sonunda oluşturulmuş mikroküreler çapraz bağlama çözeltisinden ayrılmış 3 kez 280 rpm hızda de-iyonize su ile yıkanmıştır. Elde edilen küreler ilk olarak 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılıp sonrasında sabit tartıma gelene kadar 40 °C etüv içerisinde bekletilmiştir. Denge şişme çalışmalarında kullanılacak olan 5-FU yüklü olmayan boş küreler de aynı yöntemle hazırlanmıştır. (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin oluşumu

2.5. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinin Şişme Derecelerinin Tayini

Boş mikrokürelerin şişme derecesinin belirlenmesi için 25 mg'lık örnekler farklı pH'daki tampon çözeltileri içerisinde 24 saat boyunca şişme değişimleri incelendi. 15 dakika, 30 dakika ve sonrasında 1 saat aralıklarla örneklerin yüzeyindeki çözeltiler uzaklaştırılarak şişen numuneler tartıldı ve şişme dereceleri hesaplandı. Salım deneylerinde olduğu gibi şişme deneyleri de üç kez tekrarlanmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şişme Derecesi(m/m)} = \frac{(W_{\text{şişmiş mikroküre}} - W_{\text{kuru mikroküre}})}{W_{\text{kuru mikroküre}}} \times 100$$

2.6. Mikrokürelerin İlaç Tutuklanma Verimlerinin Belirlenmesi

Tutuklanma verimi ilacın mikrokürelere ne kadar yüklendiğinin bir ölçüsüdür. Tutuklanma verimi hesabı için ilaç yüklü mikrokürelere belirli miktarda alınır. Havanda toz haline gelene kadar ezilip üzerine 50 mL pH 7,4 H₂PO₄⁻/HPO₄⁻² tamponu eklenmiştir. Daha sonra bir balona alınarak ve 4 saat süre ile geri soğutucu altında bir manyetik karıştırıcı yardımıyla ekstrakte edilmiştir. Daha sonra süspansiyon süzülerek ve 5-FU içeriği UV spektrofotometresi ile ilacın maksimum dalga boyunda (266 nm) belirlenmiştir. Tutuklanma yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmaktadır.

$$\%TV = \frac{\text{Mikroküre içindeki deneysel ilaç miktarı}}{\text{Mikroküre içindeki teorik ilaç miktarı}} \times 100$$

2.7. 5-FU'nun Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinden Salım Çalışması

Değişik formülasyonda hazırlanan Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerin ilaç salım davranışını incelemek için belirli miktarda mikroküre örnekleri, ağzı kapaklı erlenlerde 250 mL tampon çözeltilerin içerisine konularak çalkalamalı su banyosuna yerleştirilir. Salım çalışmaları, öncelikle pH=1,2 HCl çözeltisinde 3 saat, pH=5,5 asetik asit/asetat tamponunda 3 saat ve kalan sürede de pH=7,4 fosfat tamponlarında 25, 32 ve 37 °C'de 24 saat yapılmıştır. Mikrokürelerden salınan 5-FU miktarını belirlemek için çözeltilerden saatte bir üçer mL örnekler alınıp UV spektrofotometresi ile 266 nm'de absorbans değerleri belirlenmiş ve elde edilen absorbans değerlerinden kalibrasyon grafiği yardımıyla derişimler hesaplanmıştır.

2.8. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinde MTT Çalışması

Hazırlanan mikrokürelerin *in vitro* sitotoksitelerinin belirlenmesi için MTT testi kullanılmıştır. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı. Bu test hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tetrazolyumtuzu'nun kullanıldığı hassas bir metoddur. MTT, metabolik aktivite ile ilgili mitokondrial enzimler tarafından suda

çözünmeyen formazan boyaya indirgenmektedir. MTT'nin indirgenmesi primer olarak hücre içerisindeki glikolitik aktivite ile ilgili olmakla birlikte NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit) ve NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat) varlığına bağlıdır. MTT solüsyonu canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla ile oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolium halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. Canlı hücrelerde gözlenen renk değişimi Elisareader'da yapılan okuma sonundaki absorbance değerlerini verir.

L929 fibroblast hücreleri 48 well-platelere her bir kuyucuğa 10×10^3 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha önceden hazırlanan 1mg/mL'lik aşı kopolimer ve mikroküre örneklerinden belirlenen derişimlerde (0- 6,25 $\mu\text{g/mL}$ - 12,5 $\mu\text{g/mL}$ – 25 $\mu\text{g/mL}$ – 50 $\mu\text{g/mL}$ – 100 $\mu\text{g/mL}$ – 200 $\mu\text{g/mL}$) hücrelerin üzerine uygulanıp, 24 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece besi ortamı hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 100 μL besiyeri ve 20 μL MTT çözeltisi ilave edilmiştir. 37 °C'de 3,5 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 150 μL MTT solventi (DMSO) eklenerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının tespiti için 48 kuyucukluplate'in absorbans değerleri ELİSA plate okuyucuda 570 nm'de okutulmuştur. Kontrol grupları baz alınarak % canlılık hesaplanmıştır.

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A RNA'yı boyamaz bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst boyama: apoptotik hücreleri boyar. Böylece gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidiumiodide: DNA'yı ve RNA'yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. İkili boyama için 48 well plate kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de 10×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. 48 well plate'de her kuyucuğa 100 μL hücre koyulmuş ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılmıştır. 48 well plate'in tüm kuyucuklarına 150 μL medyum koyulmuştur. Daha önceden hazırlanan 1 mg/mL lik polimer örneklerinden belirlenen derişimlerde (0 - 6,25 $\mu\text{g/mL}$ - 12,5 $\mu\text{g/mL}$ – 25 $\mu\text{g/mL}$ – 50 $\mu\text{g/mL}$ – 100 $\mu\text{g/mL}$ – 200 $\mu\text{g/mL}$) hücrelerin üzerine

uygulanıp, 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna sadece medyum eklenip, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılır ve her kuyucuğa 70 µL ikili çalışma solüsyonu (doublestaining çalışma solüsyonu) eklenip, 48 well plate hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (Floresein izotiyosiyanat, 480 – 520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.



3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmanın ilk bölümünde, pektine DEAAm monomeri, seryum amonyum nitrat başlatıcısı kullanılarak mikrodalgada aşılalmıştır. Aşılama için ortam koşullarının etkisini incelemek amacıyla, aşılama süresi, reaksiyon sıcaklığı, mikrodalga gücü, monomer derişimi, başlatıcı derişimi, TEMED derişimi, polimer derişimi gibi parametrelerin aşılama üzerine etkisi incelenmiştir. Aşı kopolimerlerin optimum aşılama koşulları bulunmuştur. Sentezlenen aşı kopolimer yapıları FTIR-Raman, NMR, DSC, TGA, SEM ve GPC ile karakterize edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, sentezlenen aşı kopolimerlerin 5-FU içeren mikroküreleri, kitosan kaplama ve çinko klorür ile çapraz bağlanarak oluşturulmuştur. 5-FU'nun *in-vitro* ilaç salımına etkisini incelemek amacıyla, aşı yüzdesi, sıcaklığın etkisi, polimer derişimi, ilaç/polimer oranı, çapraz bağlayıcı derişimi, çapraz bağlama süresi gibi parametrelerin farklı pH ve sıcaklıkta etkileri araştırılmıştır. Mikroküreler tutuklanma verimleri, şişme dereceleri, partikül boyutları ile karakterize edilmiştir. Boş mikrokürelerin farklı pH ve sıcaklıktaki şişme dereceleri incelenmiştir. Mikrokürelerin ATR-FTIR ölçümleri ile kimyasal kararlılığı, DSC analizi ile camı geçiş sıcaklığı, XRD analizi sonuçları ile kristalin yapısı, SEM ve AFM analizleri ile yüzey morfolojileri incelenmiştir.

3.1. Pektin Aşı Kopolimerizasyonu

Mikrodalga etkisi altında pektin polimeri üzerine potasyum peroksidisülfat ve seryum amonyum nitrat (CAN) başlatıcıları kullanılmış ancak potasyum peroksidisülfat başlatıcısı kullanıldığında aşılama sonunda çöktürme işlemi aşamasında % 100 çökme sağlanamamıştır. Sonuç olarak literatürde çokça kullanılan seryum amonyum nitrat başlatıcısı ile çalışılması uygun görülmüştür.

Ayrıca pektine aşı çalışması mikrodalga ortamında ve dışarıda geleneksel ısıtma yöntemi ile yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Mikrodalga ışıını kullanıldığında ortamda daha fazla radikallerin oluştuğu ve bunlarında aşı yüzdesini artırdığı düşünülmüştür.

Çizelge 3.1. Mikrodalga'nın aşı yüzdesine etkisi

Mikrodalga Etkisi Altında Aşılama	Aşı Yüzdesi= %34,16 ± 1,087 (t=4 saat, T=25 °C, M.G=500 Watt, [CAN]=1,8x10 ⁻³ M, [DEAAm]=0,146 M, [TEMED]=0,66x10 ⁻³ M, [HNO ₃]=0,0397 M, [Pektin]= 2 g/dL)
Dış Ortamda Aşılama	Aşı Yüzdesi= %18,90 ± 2,435 (t= 4 saat, T=25 °C, [CAN]=1,8x10 ⁻³ M, [DEAAm]=0,146 M, [TEMED]=0,66x10 ⁻³ M, [HNO ₃]=0,0397 M, [Pektin]=2 g/dL)

3.2. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Kopolimerinin Yapısal Karakterizasyonu

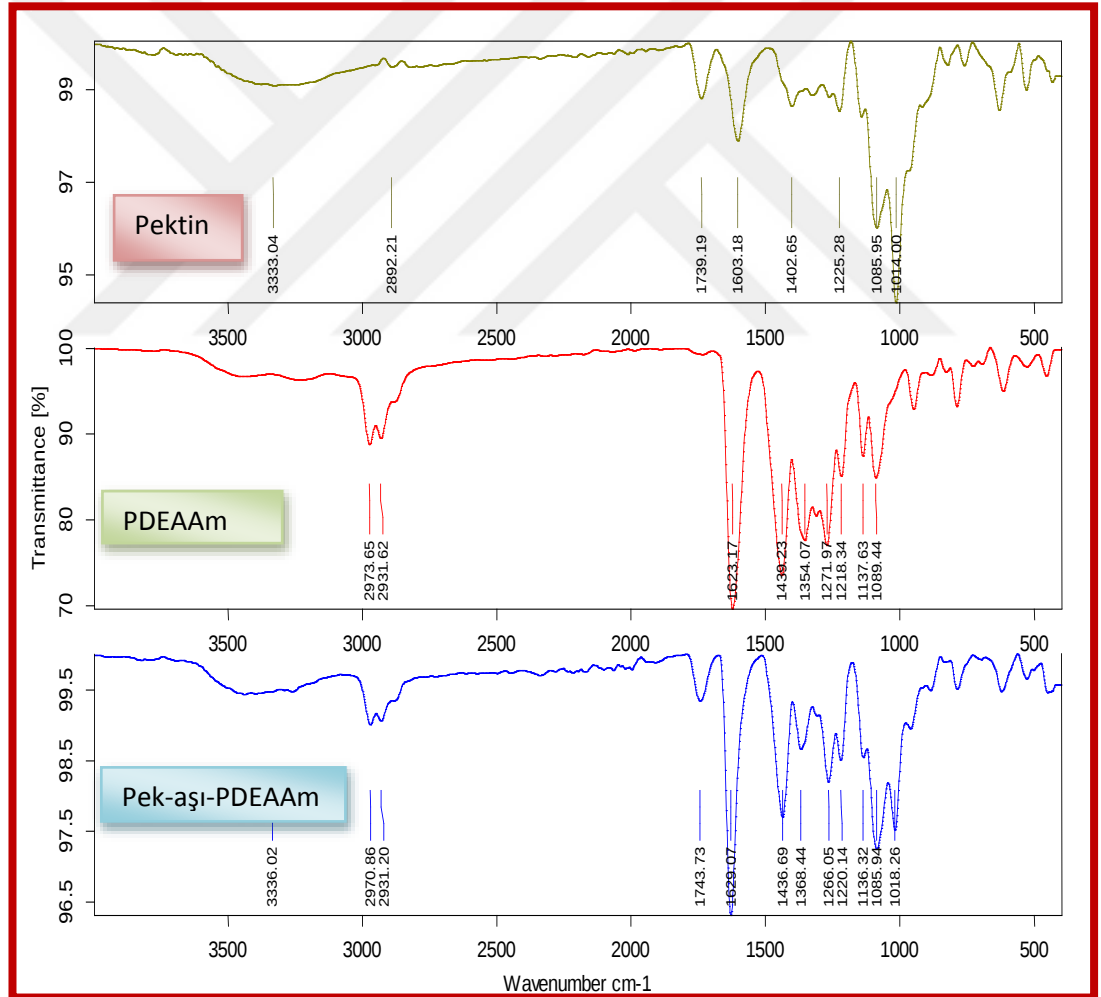
3.2.1. Pektin, Pek-aşı-PDEAAm ve PDEAAm'ın FTIR ve RAMAN Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Şekil 3.1'de pektin, PDEAAm ve % 166,6 aşı yüzdesine sahip Pek-aşı-PDEAAm aşı kopolimerin FTIR spektrumları sunulmuştur. Pektin spektrumu incelendiğinde; 3333 cm⁻¹'de görülen yayvan pik OH gerilme titreşimlerini göstermektedir. Spektrumunda 2892 cm⁻¹'de görülen pikin C-H gerilmelerine, 1739 cm⁻¹'lerde belirlenen pikin C=O gerilmelerine (metoksi grubuna bağlı), 1603 cm⁻¹'de belirlenen pikin iyonik karboksil gruplarındaki C=O gerilmesine, 1402 cm⁻¹'de bulunan pikin C-O-H titreşim gerilmelerine, 1225'deki pikin asimetrik metoksi -O-CH₃ grubuna ait C-O-C gerilmelerine, 1085 ve 1014 cm⁻¹ aralığında gözlenen piklerin ise C-O-C gerilmelerine ait olduğu tespit edilmiştir. Gopi ve arkadaşları, pektin için benzer titreşimler rapor etmişlerdir [69].

Poli(N,Ndietilakrilamid)'in FTIR spektrumunda, 2973, 2931 cm⁻¹'de gözlenen pikler C-H titreşim gerilmesine, 1623 cm⁻¹'de gözlenen pikin C=O amid bağı gerilmesine, 1439 ve 1354 cm⁻¹'deki piklerin sırasıyla asimetrik C-N ve -CH₂, -CH₃ gruplarındaki C-H titreşim gerilmesine, 1271 cm⁻¹'de bulunan pikin C-N simetrik gerilme

titreşimlerine, 1137 cm^{-1} 'de alifatik C-N eğilme titreşimlerine rastlanmıştır. Literatürlerde benzer sonuçlar rapor edilmiştir [70].

Pek-aşı-PDEAAm aşırı kopolimerin spektrumundaki 3336 cm^{-1} 'de gözlenen pik pektinden gelen OH gerilmesine, $2970, 2931\text{ cm}^{-1}$ pektin ve PDEAAm den gelen C-H gerilmesine, 1743 cm^{-1} 'de görülen pik pektinden gelen C=O gerilmesine, 1629 cm^{-1} 'deki PDEAAm den gelen pik C=O gerilmesine karşılık geldiği saptanmıştır. Ayrıca 1436 ve 1368 cm^{-1} 'de C-N ve C-H gerilmesine, 1266 cm^{-1} 'de C-N gerilmesi, 1085 ve 1018 cm^{-1} 'de pektinden gelen C-O-C gerilmelerine ait olduğu düşünülmektedir. FTIR sonuçlarından aşılamanın gerçekleştiği doğrulanmıştır. FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

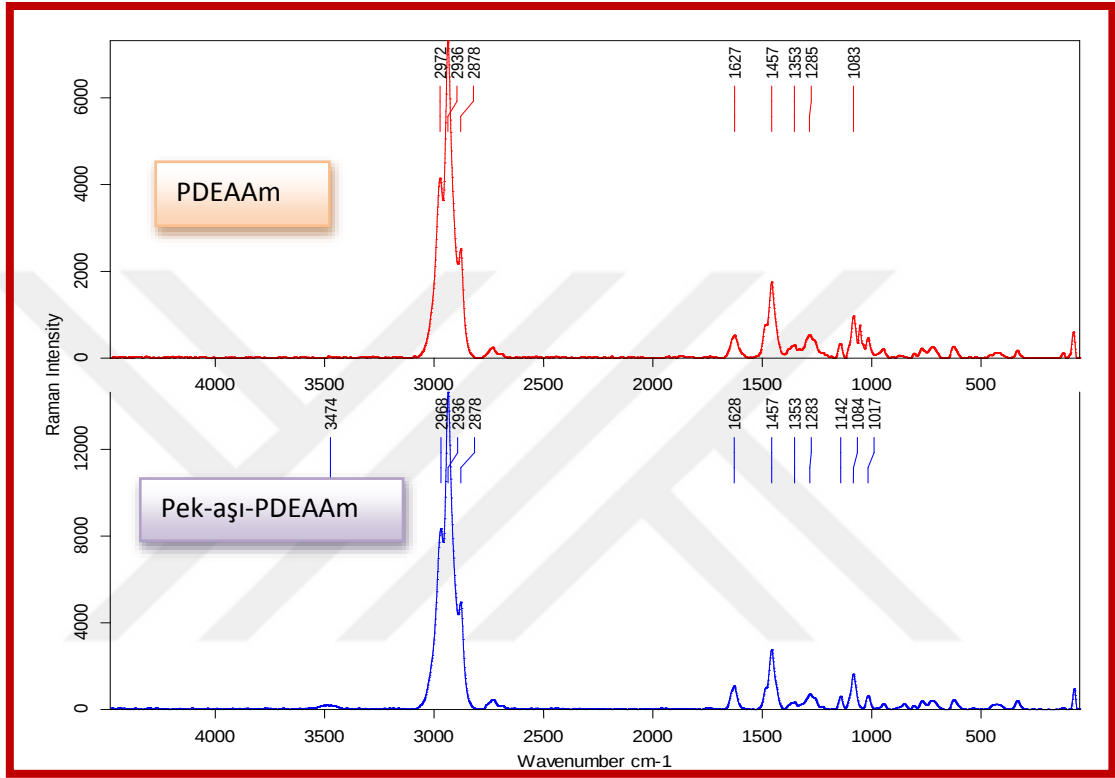


Şekil 3.1. Pektin, PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm'nin FTIR spektrumu

Çizelge 3.2. Pektin, PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm'nin FTIR sonuçları

Polimer	cm⁻¹	Açıklaması
Pektin	3333	OH gerilme titreşimi
	2892	C-H gerilme titreşimi
	1739	C=O gerilme titreşimi
	1603	İyonik karboksil grubu C=O gerilme titreşimi
	1402	Simetrik C=O gerilme titreşimi
	1225	Asimetrik metoksi(-O-CH ₃) grubuna ait COC gerilme titreşimi
	1085, 1014	C-O-C gerilme titreşimi
PDEAAm	2973, 2931	C-H gerilme titreşimi
	1693	C=O gerilme titreşimi (azota bağlı)
	1439	Asimetrik C-N gerilme titreşimi
	1354	CH ₂ ve CH ₃ gruplarına ait C-H gerilme titreşimi
	1271	Simetrik C-N eğilme titreşimi
	1137	Alifatik C-N eğilme titreşimi
Pek-aşı-PDEAAm	3336	Pektine ait OH gerilme titreşimi
	2970, 2931	Pektin ve PDEAAm' ye ait C-H gerilme titreşimi
	1743	Pektine ait C=O gerilme titreşimi
	1629	PDEAAm ve pektine ait C=O gerilme titreşimi
	1436- 1368	Pektin ve PDEAAm ait simetrik C=O, asimetrik C-N, C-H gerilme titreşimi
	1266	Simetrik C-N gerilme titreşimi
	1220	Pektine ait COC gerilme titreşimi
	1136	PDEAAm den gelen C-N eğilme titreşimi

PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm RAMAN sonuçları Şekil 3.2 de ve değerlendirmesi Çizelge 3.3 de sunulmuştur. Şekil ve çizelgede belirtildiği gibi FTIR sonuçları ile RAMAN sonuçları birbirini desteklemektedir. Pektinin RAMAN spektrumu alınamamıştır. Bu durumun kullanılan pektinin yapısından dolayı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.2. PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm'in Raman spektrumları

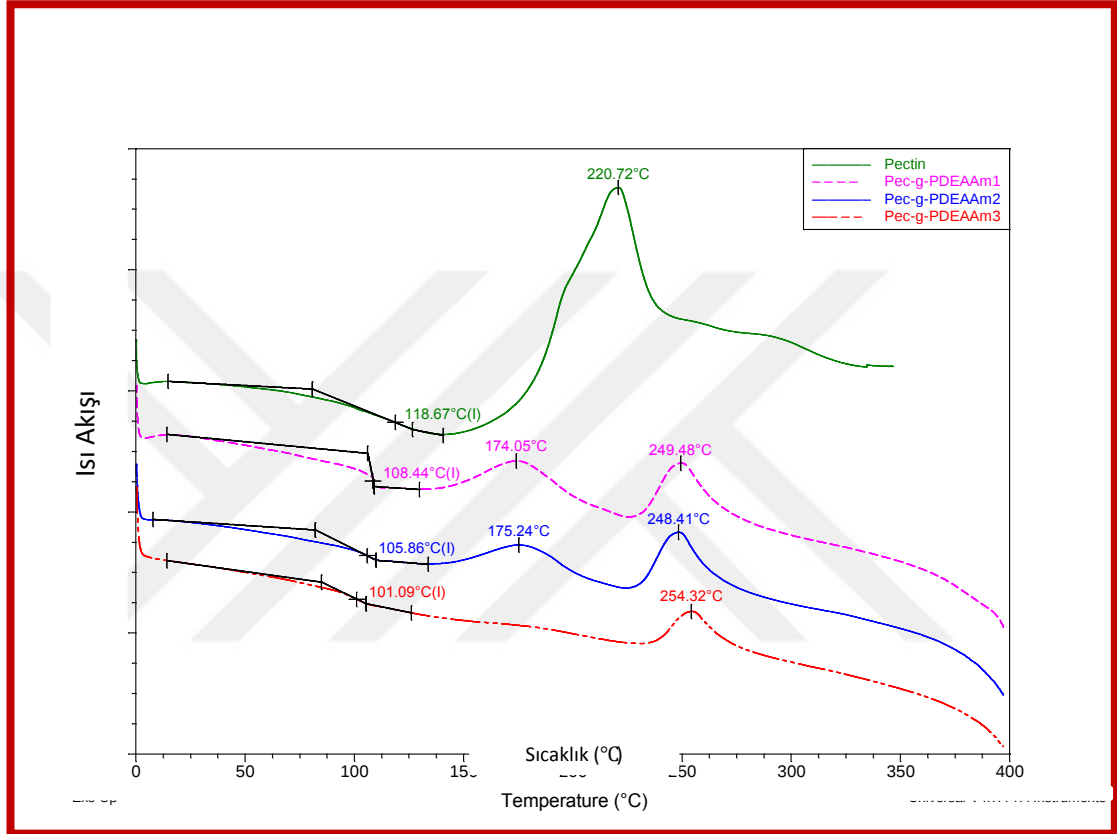
Çizelge 3.3. PDEAAm ve Pek-aşı-PDEAAm'nin Raman spektrumu

<u>Polimer</u>	<u>cm⁻¹</u>	<u>Açıklaması</u>
PDEAAm	2972,2936, 2878	C-H gerilme titreşimi
	1627	C=O (azota bağlı) gerilme titreşimi
	1457	CH ₂ veya CH ₃ gruplarının C-H gerilme titreşimi
	1285	Alifatik C-N gerilme titreşimi
	1145	C-N eğilme titreşimi
Pek-aşı- PDEAAm	3474	Pektine ait OH gerilme titreşimi
	2968,2936, 2878	Pektin ve PDEAAm ait C-H gerilme titreşimi
	1745	Pektine ait C=O gerilme titreşimi
	1457	Simetrik C=O ve C-N asimetrik gerilme titreşimi
	1353	PDEAAm'ye ait C-H gerilme titreşimi
	1283	PDEAAm'ye ait C-N gerilme titreşimi
	1140, 1084	Pektine ait C-O-C gerilme titreşimi
	1017	C-O-C gerilme titreşimi

3.2.2. DSC Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Aşı kopolimerlerin termal davranışlarını incelemek amacıyla DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Pektin, farklı yüzdelerdeki aşı kopolimerlerin ve PDEAAm'nin DSC termogramları Şekil 3.3 de sunulmuştur. Pektinin DSC termogramında 0-150 °C aralığında bir endoterm geçiş ve yaklaşık 150-250 °C aralığında bir ekzoterm pik gözlenmiştir. Termogramdan DEAAm monomerinin aşılınması ile endotermik pikin sonlanma sıcaklığının aşı yüzdesi artmasıyla birlikte arttığı gözlenmiştir. Polimerlerin T_g değerleri gözlenen endoterm değişimlerden belirlenmiş ve Çizelge 3.4'de

sunulmuştur. Çizelgeden, farklı aşı yüzdeli Pek-aşı-PDEAAm'nin T_g değerlerinin pektin T_g değerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca aşı yüzdelerinin artmasıyla T_g değerinde de azalma gözlenmiştir. T_g 'nin azalması PDEAAm birimlerinin artmasıyla daha amorf yapının oluşmasından kaynaklandığı, dolayısı ile zincirler arası daha fazla serbest hacmin oluştuğu düşünülmüştür [71].



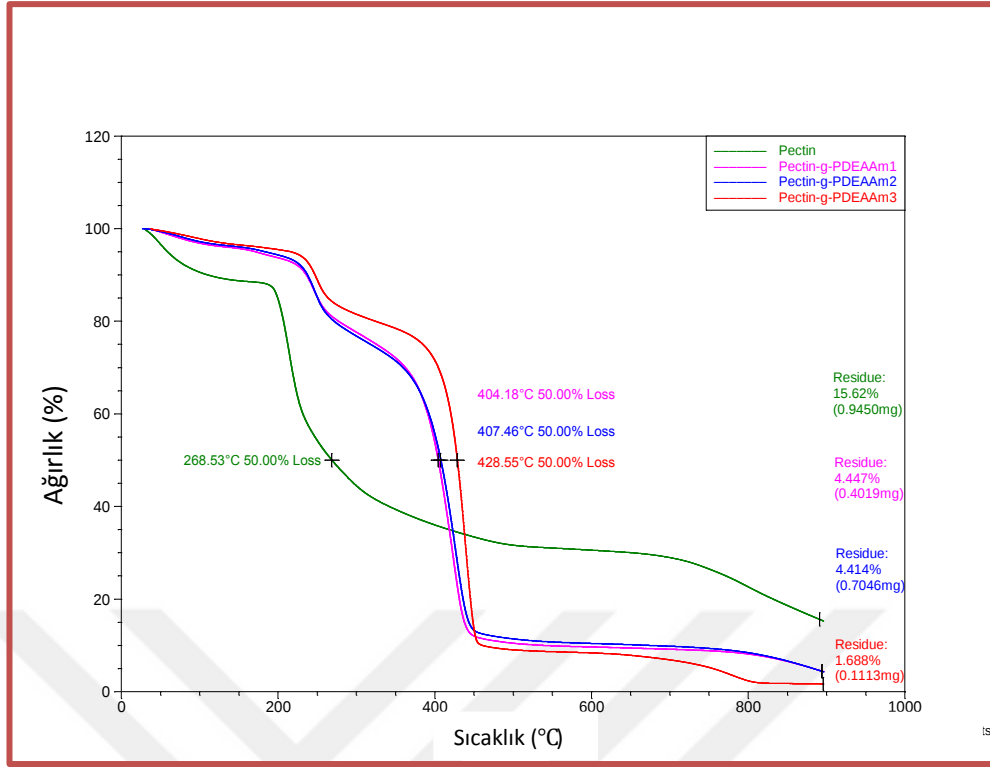
Şekil 3.3. Pektin ve farklı aşı yüzdelerdeki kopolimerlerin DSC termogramı

Çizelge 3.4. Pektin ve farklı yüzdelerdeki aşı kopolimerlerin T_g değerleri

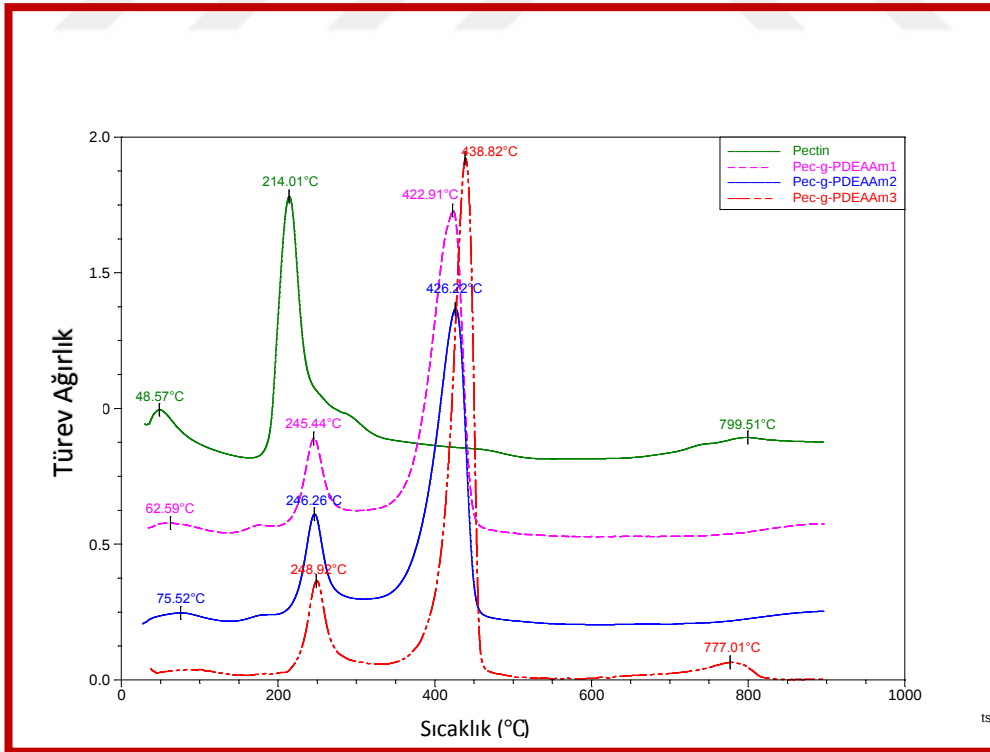
Polimer	Aşı (%)	T _g (°C)
Pektin	-	118
Pektin-aşı-PDEAAm 1	23	108
Pektin-aşı-PDEAAm 2	75	106
Pektin-aşı-PDEAAm 3	118	101

3.2.3. TGA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Pektin ve aşı kopolimerlerin termogravimetrik analiz sonuçları Şekil 3.4 ve 3.5’de sunulmuştur. Pektin termogramı incelendiğinde 30-175 °C ve 175-325 °C sıcaklık aralığında iki temel bozunma gözlenmiştir. 30-175 °C sıcaklık aralığındaki kütle kaybı polimerin yapısındaki suyun uzaklaşmasına, 175-325 °C sıcaklık aralığındaki maksimum bozunma hızını 214 °C da gösteren kütle kaybı ise CH₄, CO₂ ve H₂O ayrılmasıyla pektin depolimerizasyonuna atfedilmiştir. Pektin kütlesinin % 50’sini kaybettiği sıcaklık 268 °C olarak tespit edilmiştir. Pektin-aşı-PDEAAm’nin sıcaklık bozunması ise temel olarak 30-175 °C, 175-325 °C ve 325-500 °C sıcaklık aralıklarında üç bozunma basamağından oluşmaktadır. 30-175 °C sıcaklık aralığında Pektin-aşı-PDEAAm’nin yapısındaki adsorplanan suyun ayrılması gerçekleşmiştir. 175-325 °C sıcaklık aralığında ve maksimum 239 °C’de maksimum bozunma hızını gösteren pik, CH₄, potasyum karbonat, CO₂ oluşumları ile aşı kopolimerin depolimerizasyonunu göstermektedir. 325-500 °C sıcaklık aralığındaki 429 °C’deki maksimum bozunma hızlı pik PDEAAm’nin bozulmasına atfedilmektedir. 23, 75 ve 118 aşı yüzdeli aşı kopolimerler için kütlesinin %50 sini kaybettiği sıcaklık sırasıyla 405, 407 ve 429 °C olarak bulunmuştur. Bu verilerden yapıya DEAAm aşılması ile termal kararlılığın arttığı söylenebilir. TGA eğrisi ile DSC termogramının aynı sıcaklık aralıklarında değişimler verdiği için TGA verileri DSC termogramını destekler nitelikte bulunmuştur. Benzer sonuçlar literatürlerde de bildirilmiştir [72]. Gupta ve arkadaşlarının yaptığı pektin nano kompozit fotokatalik ve anti bakteriyel aktivite çalışmasında, pektin TGA analizinde % 6,8 kütle kaybı 175-185 °C, %28 kütle kaybını 175- 520 °C aralığında olduğu bildirilmiştir [72].



Şekil 3.4. Pektin ve farklı aşı yüzdelerindeki kopolimerlerin TGA termogramı

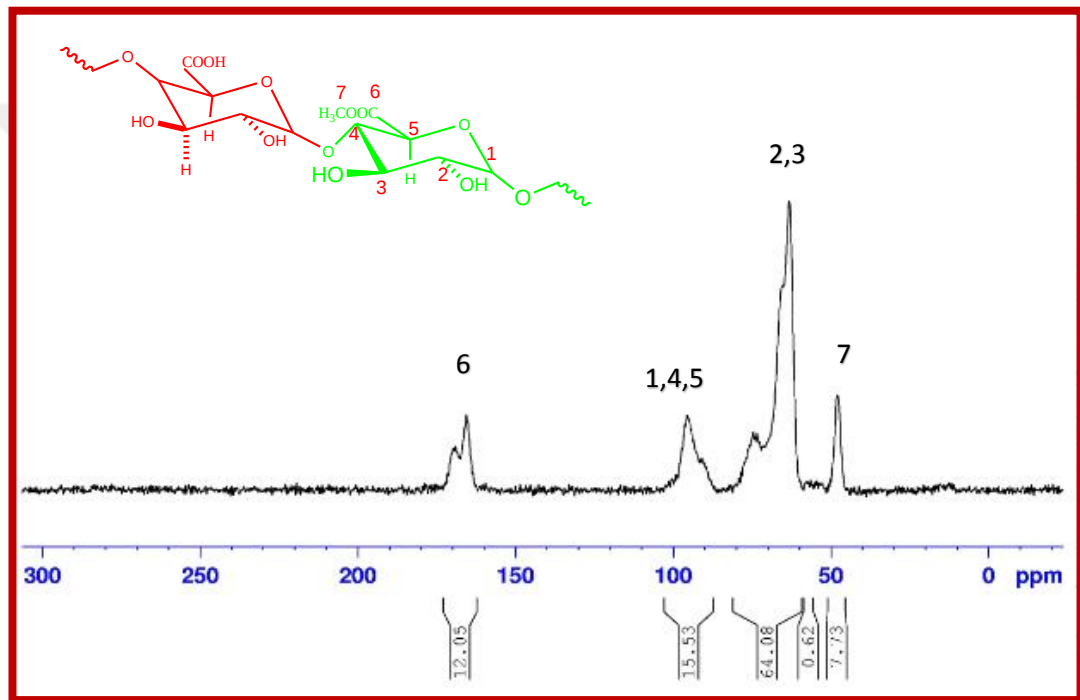


Şekil 3.5. Pektin ve farklı aşı yüzdelerindeki kopolimerlerin DTGA termogramı

3.2.4. ^{13}C -NMR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Şekil 3.6’da pektinin ^{13}C -NMR spektrumunu verilmiştir. Spektrumdaki 48 ppm’deki kimyasal kaymalar pektinin yapısında bulunan $-\text{OCH}_3$ grubu karbonuna, 60-80 ppm aralığındaki pik galaktronik asidin halka içi karbonlarına ait olduğu düşünülmektedir.

Kimyasal kayma değeri 90-100 ppm aralığındaki pik pektinin galaktronik asit birimlerinin anomerik karbonu ve 165-172 ppm aralığındaki pik $-\text{C}=\text{O}$ karbonuna ait olduğu düşünülmektedir.

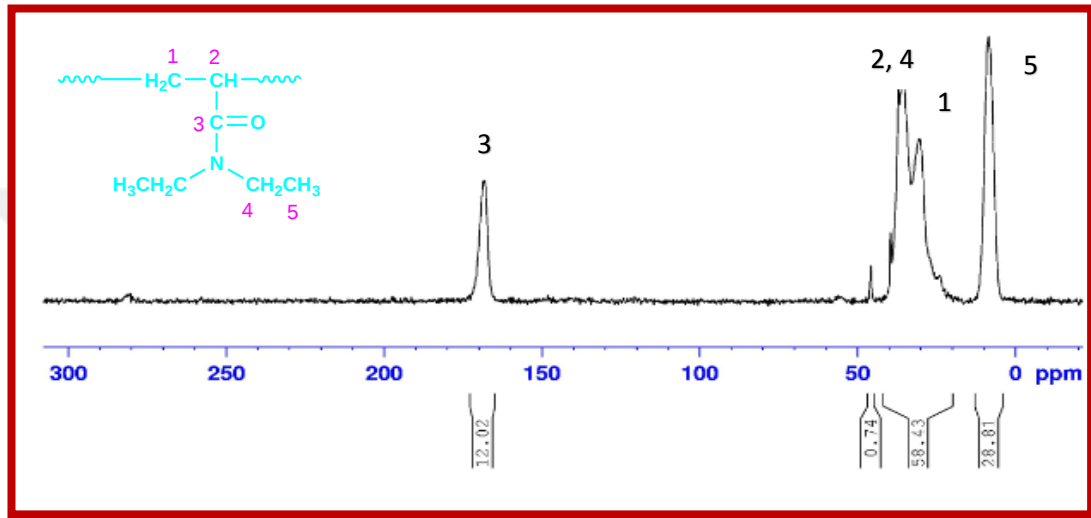


Şekil 3.6. Pektinin ^{13}C -NMR spektrumu

Benzer çalışmalar literatürde bulunmaktadır [73, 74]. Örneğin; Vriesmann’ın yapmış olduğu çalışmada; 100,1 ve 99,3 ppm’deki pik esterlenmiş ve esterlenmemiş galakturonik asit biriminindeki C atomlarına, 171-174 ppm’deki piklerin $-\text{C}=\text{O}$ grubu karbonuna karşılık geldiğini ve 53 ppm deki pikin $-\text{OCH}_3$ grubu C atomlarına ait oldukları rapor edilmiştir [73].

PDEAAm yapı iskeleti aşağıda verilmiştir ve Şekil 3.7’de sunulmuştur. Monomer yapısına göre PDEAAm NMR spektrumu aşağıdaki gibi yorumlanmıştır.

Spektrum incelendiğinde 6 ve 7 nolu gruplar: 11 ppm’deki metil gruplarındaki karbon atomuna ait olduğu düşünülmektedir. 1, 2, 6 ve 7 nolu gruplar: 20- 50 ppm’deki azot atomuna bağlı ve zincirdeki $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}$ karbon atomlarını, 4 nolu grup: 170 ppm’deki azot atomuna bağlı $-\text{C}=\text{O}$ karbon atomlarını işaret etmektedir.

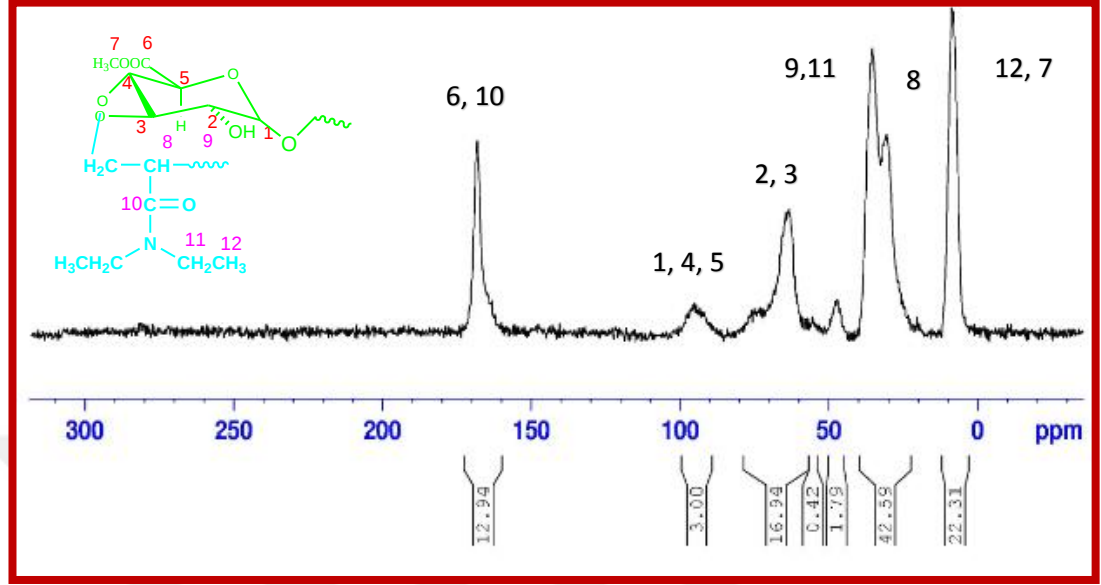


Şekil 3.7. PDEAAm’nin ^{13}C -NMR spektrumu

Benzer olarak literatürde $-\text{CO}-\text{N}-$ amid bağı 150-180 ppm aralığında, $-\text{CH}_2-(\text{RCH}_2\text{R})$ karbonları 10-50 ppm aralığında, 0-40 ppm’de $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ akil gruplarının karbon atomlarına ait kimyasal kaymaları rapor edilmiştir [75].

Pek-aşı-PDEAAm’in ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.8’de sunulmuştur. Spektrum incelendiğinde 0-15 ppm aralığında PDEAAm’dan gelen $-\text{CH}_3$ ve $-\text{OCH}_3$ gruplarının karbonunu, 15-40 ppm aralığında PDEAAm’dan gelen $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}$ gruplarının karbonunu, 60-85 ppm’de pektinden gelen farklı konumlardaki karbon atomlarını, 85-100 ppm’de pektinden gelen galakturonik asit birimindeki esterlenmiş ve esterlenmemiş anomerik karbonu, 170 ppm’de hem pektinden gelen $-\text{COO}$, hem de PDEAAm den gelen $-\text{CO}-\text{N}$ karbonlarını gösterdiği düşünülmektedir.

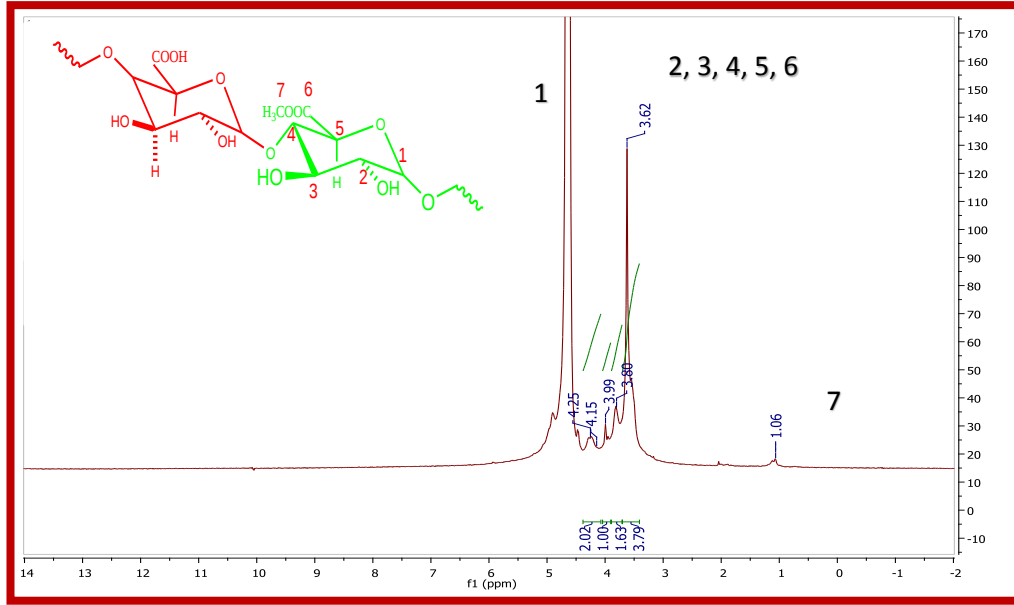
Böylelikle ^{13}C -NMR analizleri ile pektin yapısına PDEAAm gruplarının aşılandığı doğrulanmıştır.



Şekil 3.8. Pek-aşı-PDEAAm'nin ^{13}C -NMR spektrumu

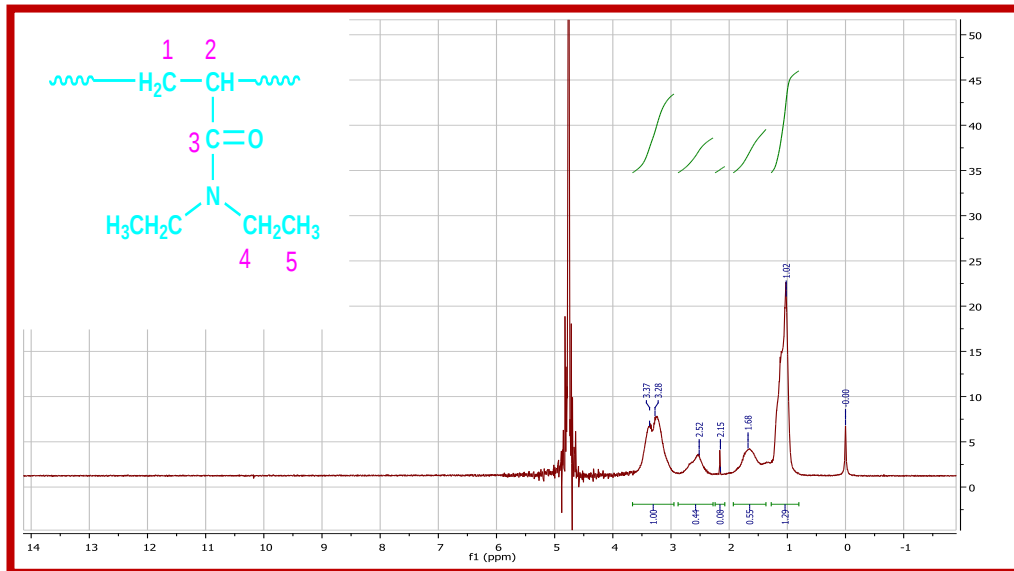
3.2.5. ^1H -NMR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Pektinin ^1H -NMR spektrumu, Şekil 3.9'da verilmiştir. Spektrumda $-\text{COOCH}_3$ 'ün (metilester) protonuna ait pikin 1,06 ppm'de olduğu görülmektedir. 3,99, 4,15 ve 4,25 ppm'de görülen piklerin pektin yapısındaki çeşitli konumlardaki $-\text{CH}$ ve $-\text{OH}$ protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. 5 ppm civarındaki pik çözücü D_2O 'ya aittir. Benzer sonuçlara literatürlerde de rastlanmıştır [76, 77]. Ma ve Wang, çalışmasında şeker pancarından elde edilen pektin darbeli elektrik alan-destekli modifikasyonu çalışmasında CH_2 protonu 1,27 ppm'de, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ protonu ise 1,63 ppm de ve CH_2COO protonu ise 2,16 ppm'de olduğunu bildirilmiştir [76].



Şekil 3.9. Pektinin ^1H -NMR spektrumu

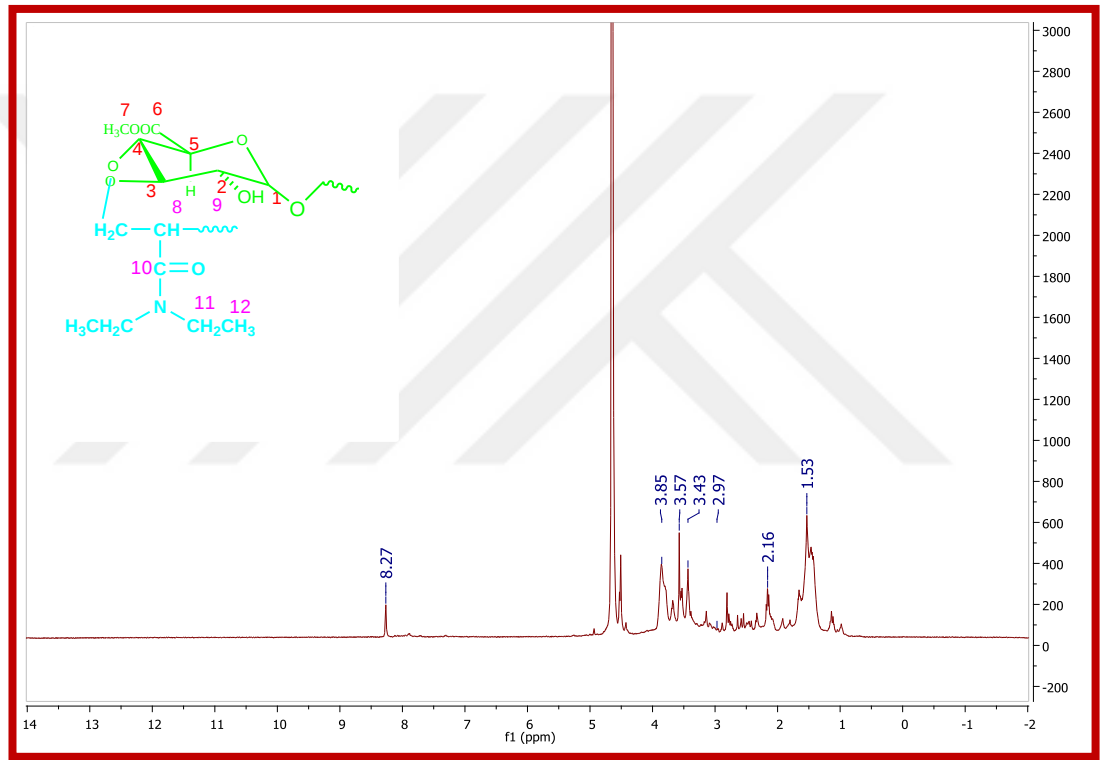
PDEAAm'ın ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.10'da verilmiştir. 3,37 ve 3,28 ppm'deki pikler CH_2 protonlarından kaynaklanmaktadır. 2,52 ppm civarındaki pik $-\text{CH}$ protonuna aittir. 2,15 ppm safsızlık olabilir. PDEAAm ana zincirindeki $-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}_3$ protonlarına ait pikler 1,68 ppm ve 1,02 ppm arasında görülmektedir.



Şekil 3.10. PDEAAm'nin ^1H -NMR spektrumu

Pek-aşı-PDEAAm'ın ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.11'de sunulmuştur. Aşı kopolimerin spektrumlarından 1,53 ppm'deki pik PDEAAm den gelen CH_3 'e ait protonu göstermektedir. 2,16 ppm'deki pik $-\text{CH}_2$ protonlarını göstermektedir. 2,97 ve 3,85 ppm aralığında meydana gelen pikler ise pektin ve aşılana PDEAAm gruplarındaki $-\text{OH}$ ve $-\text{CH}$ protonlarına atfedilmiştir.

Benzer çalışmalar literatürlerde de görülmektedir. Spevacek ve arkadaşları N,N-dietilakrilamidin ^1H -NMR spektrumu incelemişler ve 1,7 ve 2,25 ppm piklerinde CH_3 ve CH_2 protonlarından kaynaklandığı rapor etmişlerdir [78].

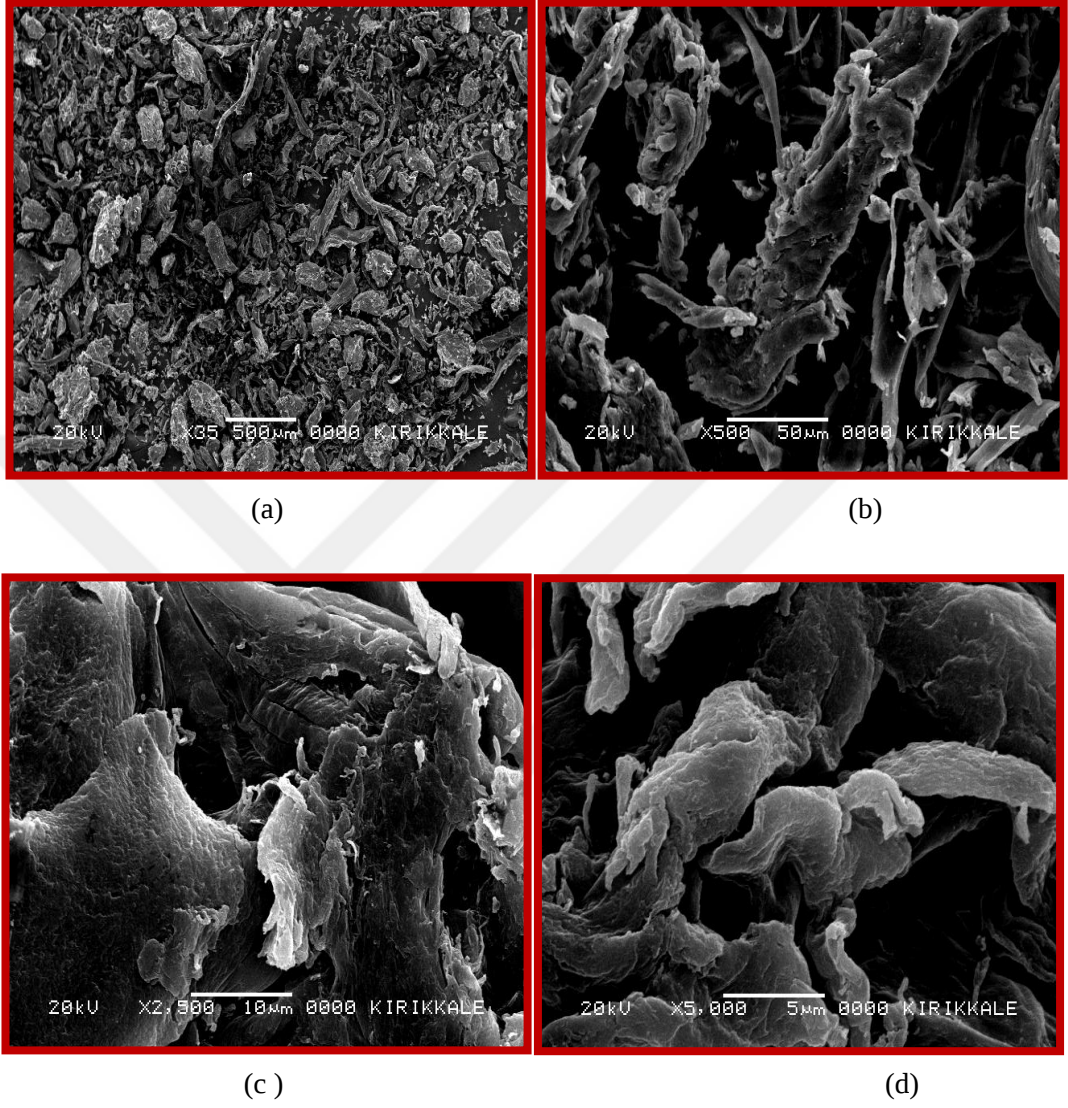


Şekil 3.11. Pek-aşı-PDEAAm'nin ^1H -NMR spektrumu

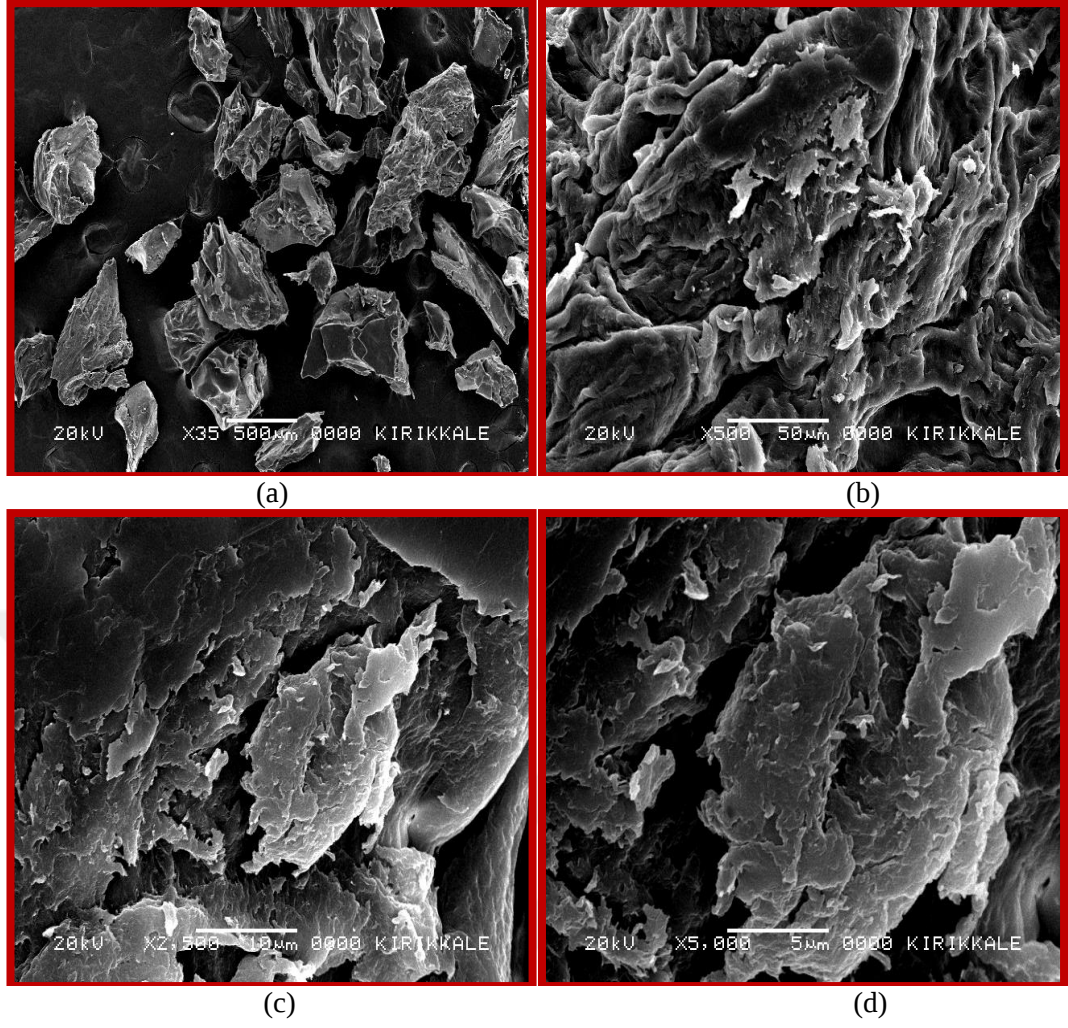
3.2.6. Pektin ve Aşı Kopolimer SEM Analizi

Pektin ve aşı kopolimerlerin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM resimleri sırasıyla Şekil 3.12 ve 3.13'de sunulmuştur. Pektin SEM görüntüleri incelendiğinde daha tanecikli yapılar görülmektedir. Pektine PDEAAm aşılama ile pektin yapı modifikasyonları gerçekleşmiş ve yüzey daha pürüzlü hale gelmiştir. Aşılama sonrasındaki bu değişim

pektin üzerine PDEAAm eklenmesine atfedilmektedir. Benzer sonuçlara literatürlerde de rastlanmıştır [79].



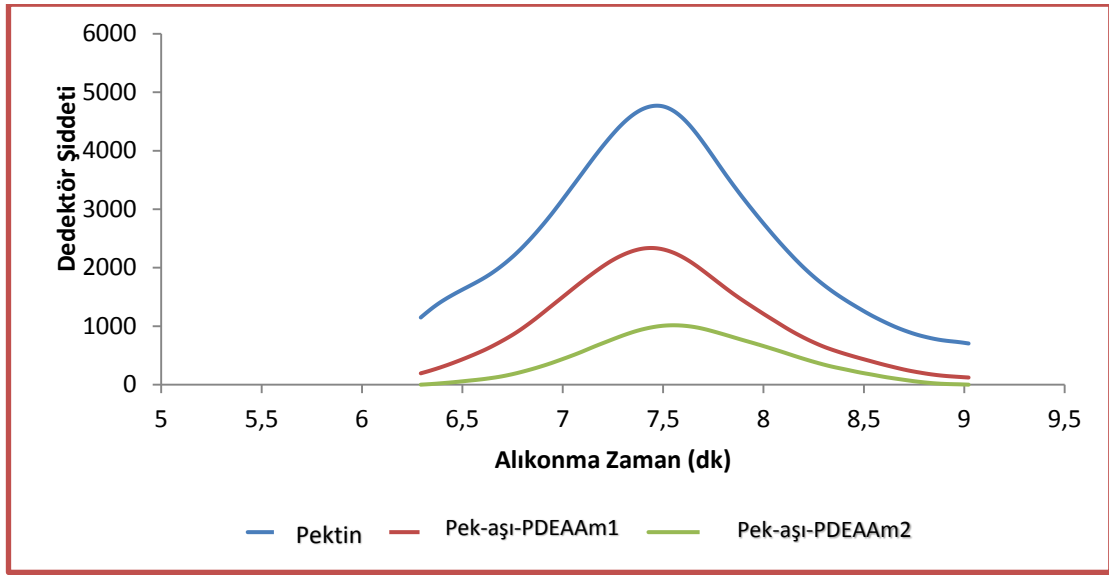
Şekil 3.12. Pektinin SEM fotoğrafları (a) 35, (b) 500, (c) 2500 ve (d) 5000 büyütmeli



Şekil 3.13. Aşı kopolimerin SEM fotoğrafları (a) 35, (b) 500, (c) 2500 ve (d) 5000 büyütme

3.2.7. GPC-SEC Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SEC analizi için suda çözülmüş %1'lik pektin ve aşı kopolimerleri kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 1 mL/min akış hızında 0,1 M NaNO₃ ve kolon olarak PL aquagel-OH mixed (8µm) (MW: 100-107) kullanılmıştır. Kalibrasyon için farklı mol kütlelerindeki polisakkarit standartlar kullanılmıştır. Pektin ve farklı aşı yüzdelerinde iki aşı kopolimerin (Pek-aşı-PDEAA_{m1}: %56, Pek-aşı-PDEAA_{m2}: %75) GPC-SEC analiz sonuçları alıkonma hacmine karşı dedektör sinyali incelenmiş ve Şekil 3.14'de sunulmuştur.



Şekil 3.14. Pektin ve aşı kopolimerlerin SEC alıkonma zaman değişimleri

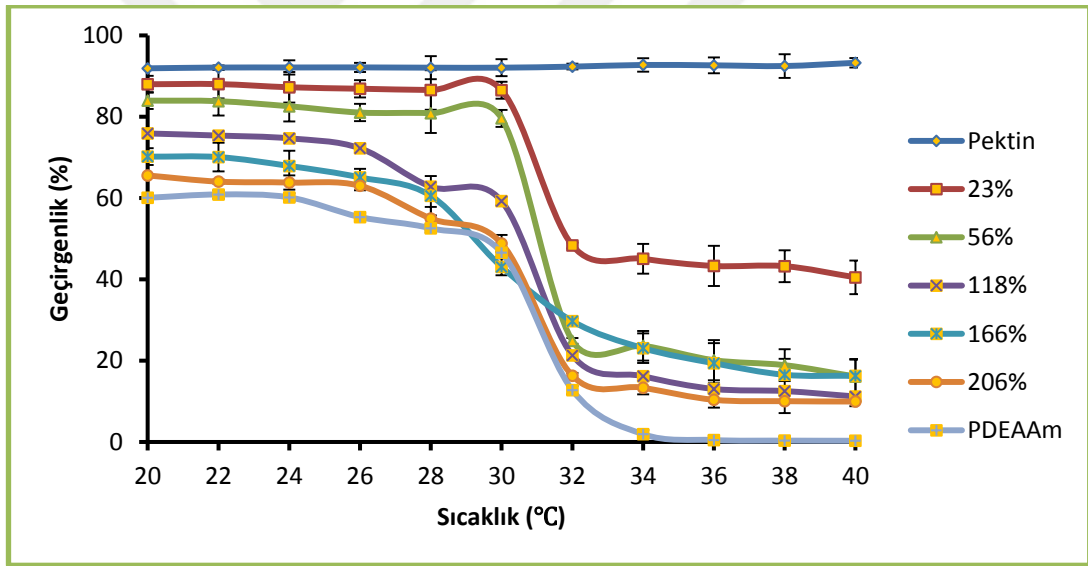
Alıkonma zamanları ve kalibrasyon doğrusundan mol kütleleri hesaplanmış ve elde edilen farklı mol kütleleri Çizelge 3.5 de verilmiştir. Sayıca ortalama mol kütlelerinin değişimi incelendiğinde aşılama ile mol kütlelerinin azaldığı, aşı yüzdesinin artması ile de arttığı görülmektedir. Bu sonuçlardan polimerizasyon sırasında mikrodalga etkisi ile altılı pektin birimlerinde kopmaların olduğu düşünülmüştür. Ayrıca çizelgeden aşılama ile polidispersitenin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç M_n ile M_w değerlerinin birbirine yaklaştığını göstermektedir. Benzer sonuçlar literatürde rapor edilmiştir [80, 81, 82].

Çizelge 3.5. Pektin ve aşı kopolimerlerde mol kütlesi sonuçları

	M_n	M_w	M_p	D
Pektin	93086	334390	184490	3,592
Pek-aşı-PDEAAm1	82888	271330	196860	3,273
Pek-aşı-PDEAAm2	84962	199460	153920	2,348

3.2.8. Pek-aşı-PDEAAm Kopolimerlerinin LCST Değerlerinin Belirlenmesi

Sıcaklığa duyarlı polimerlerin hacimsel faz geçişinin gerçekleştiği sıcaklık, alt kritik çözelti sıcaklığı (LCST) olarak adlandırılmıştır. Pektine aşıl原因 PDEAAm'nin LCST değeri ve aşı kopolimer sıcaklık geçirgenlik değişimleri Şekil 3.15'de görülmektedir. Şekilden pektinin geçirgenliğinin sıcaklıkla değişmediği, bununla birlikte aşı kopolimerlerin ve PDEAAm geçirgenliklerinin sıcaklıkla azaldığı görülmektedir. LCST değerleri aşı kopolimerlerinde ve homopolimerde 31°C olarak bulunmuştur. LCST değerinin altında bulunan sıcaklıklarda geçirgenlik artışının nedeni polimerin su ile yaptığı H bağlarından kaynaklanmaktadır. Serbest enerjinin (G), pozitif olması sonucu LCST üzerindeki sıcaklıklarda polimer-su etkileşimi yerini polimer-polimer ve su-su etkileşimi alır böylelikle kopolimerde çökme meydana gelir ve bu da faz ayrımına sebep olur [83].



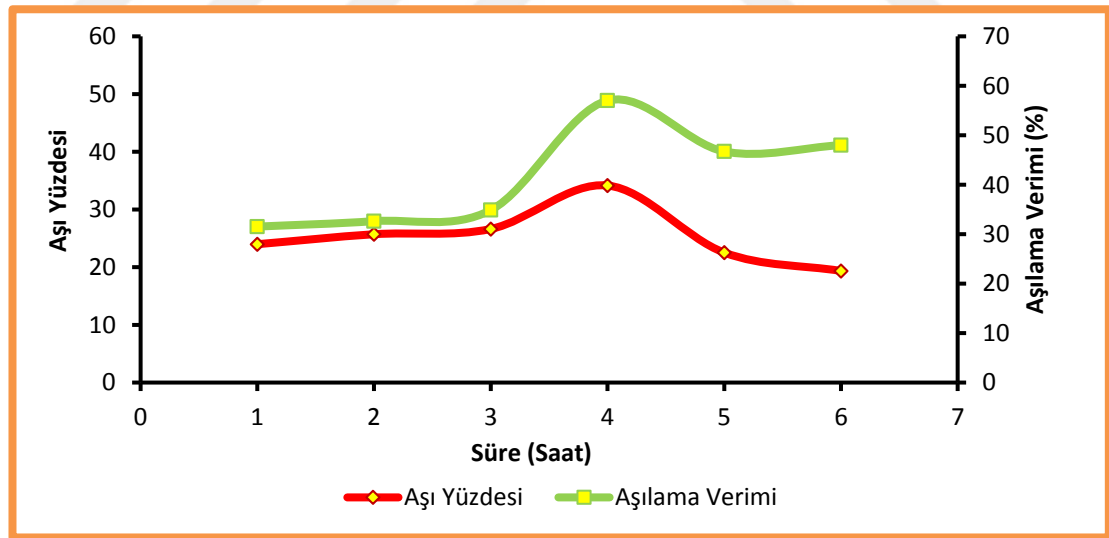
Şekil 3.15. Pektin ve farklı aşı kopolimerlerin sıcaklıkla geçirgenliklerinin değişimi

3.3. Optimizasyon Parametreleri

3.3.1. Aşılama Üzerine Süre Etkisi

Tepkime süresinin aşı yüzdesi ve aşılama verimine etkisi Şekil 3.15’de sunulmuştur. Aşılama çalışmasında diğer parametreler ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{CAN}]=1,8 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{DEAAm}]=0,146\text{ M}$, $[\text{TEMED}]=6,6 \times 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{HNO}_3]=0,0397\text{ M}$, $[\text{Pektin}]=2\text{ g/dL}$, $\text{MG}=500\text{ Watt}$) sabit tutularak, tepkime süresi 1-6 saat aralığında değiştirilmiştir. Şekil 3.16 incelendiğinde maksimum aşı yüzdesi (% 34) ve aşılama verimine (% 57) 4 saat sonunda ulaşıldığı bulunmuştur. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi süreyle birlikte önce artmış belli bir değerden sonra azalmıştır. Bu artış pektin üzerine eklenen monomer sayısının zamanla artmasına atfedilebilir.

Benzer sonuçlar literatürde de belirtilmiştir [84]. Şanlı ve arkadaşlarının çalışmasında seryum amonyum nitrat başlatıcısı kullanılarak poli(etilen teraftalat) filmi üzerine dimetil sülfoksi eklenmesiyle $[\text{CAN}]=2,0 \times 10^{-2}\text{ M}$, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{AMPS}]=0,5\text{ M}$ derişimdeki optimum koşullara 5 saat süre sonunda ulaşılmıştır [84].

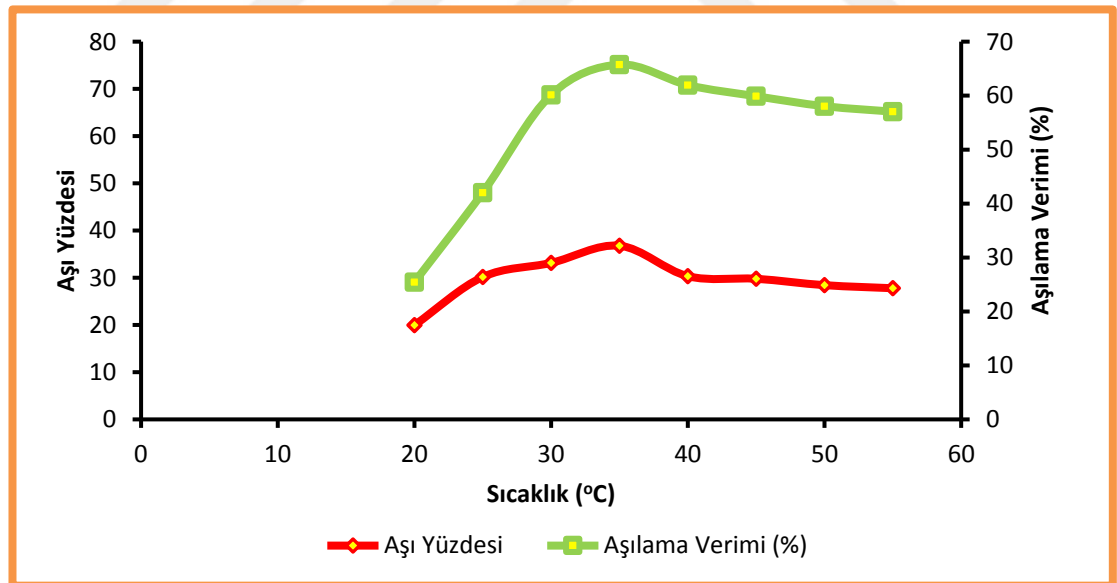


Şekil 3.16. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine süre etkisi

Çalışma Koşulları: $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{CAN}]=1,8 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{DEAAm}]=0,146\text{ M}$, $[\text{TEMED}]=6,6 \times 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{HNO}_3]=0,0397\text{ M}$, $[\text{Pektin}]=2\text{ g/dL}$, $\text{MG}:500\text{ Watt}$

3.3.2. Aşılama Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Aşılama üzerine sıcaklığın etkisi 20-55 °C sıcaklık aralığında diğer parametreler ($t=4$ saat, $[CAN]=1,8 \times 10^{-3}$ M, $[DEAAM]=0,146$ M, $[TEMED]=6,6 \times 10^{-4}$ M, $[HNO_3]=0,0397$ M, $[Pektin]=2$ g/dL, $MG=500$ Watt) sabit tutularak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.17’de verilmiştir. Maksimum aşı yüzdesi % 37 ve aşılama verimi % 66 olarak 35 °C’de bulunmuştur. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi tepkime sıcaklığı ile 35 °C’ye kadar artmış daha sonra ise azalmıştır. Sıcaklık artışı ortamdaki monomer ve başlatıcı moleküllerinin hareketliliğini artırır. Bu da pektin makro-radikallerinin sayısını artırarak daha hızlı monomer difüzyonunu sağlayacağı için aşı yüzdesi ve aşılama veriminde artma gözlenmiştir. Şekil 3.16’da görüldüğü üzere aşılama tepkimesinde 35 °C’den daha yüksek sıcaklıklarda homopolimer oluşumu daha da artmış ve bu da aşılama verimini azaltmıştır. Ayrıca 35 °C’den sonraki sıcaklıklarda sonlanma tepkimeleri ve zincir transfer tepkimelerinin hızlanmasının aşı yüzdesini ve % aşılama verimini azalttığı düşünülmüştür. Benzer sonuçlar literatürde de verilmiştir [85].

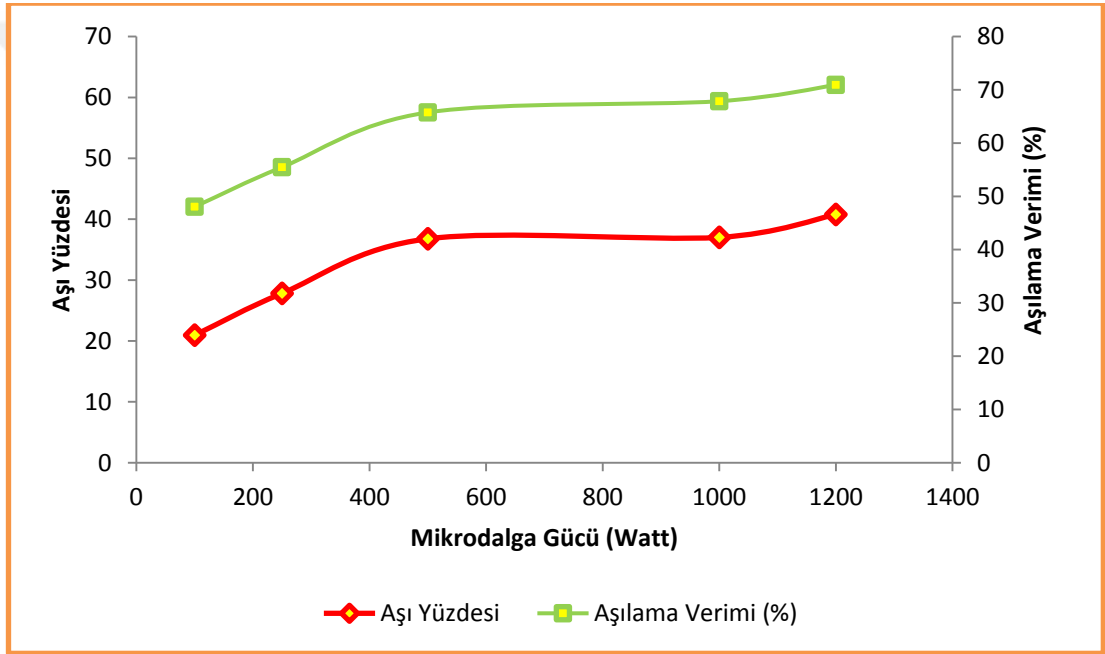


Şekil 3.17. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine sıcaklık etkisi

Çalışma Koşulları: $t=4$ saat, $[CAN]=1,8 \times 10^{-3}$ M, $[DEAAM]=0,146$ M, $[TEMED]=6,6 \times 10^{-4}$ M, $[HNO_3]=0,0397$ M, $[Pektin]=2$ g/dL, $MG=500$ Watt

3.3.3. Aşılama Üzerine Mikrodalga Gücü Etkisi

Mikrodalga gücünün aşılama etkisinin incelenmesi amacıyla 100-1200 watt aralığında diğer parametreler sabit tutularak çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.18’de verilmiştir. Şekilden mikrodalga gücünün artması ile aşı yüzdesinin ve aşılama veriminin sürekli olarak arttığı gözlenmektedir. En yüksek aşı yüzdesi 41 ve aşılama verimi de % 71 olarak 1200 watt gücünde bulunmuştur. Mikrodalga gücünün artması ile ortamda oluşan serbest radikal sayısının arttığı ve bu radikallerin pektin üzerindeki aktif merkez sayısını artırdığı düşünüldü. Böylelikle bu merkezlere bağlanan monomer sayısı artmış ve bu da aşılama parametrelerinin artmasını sağlamıştır.



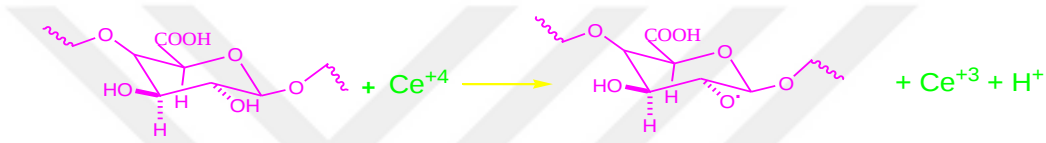
Şekil 3.18. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine mikrodalga gücü etkisi

Çalışma Koşulları: $t=4$ saat, $T=35$ °C, $[CAN]=1,8 \times 10^{-3}$ M, $[DEAAM]=0,146$ M, $[TEMED]=6,6 \times 10^{-4}$ M, $[HNO_3]=0,0397$ M, $[Pektin]=2$ g/dL

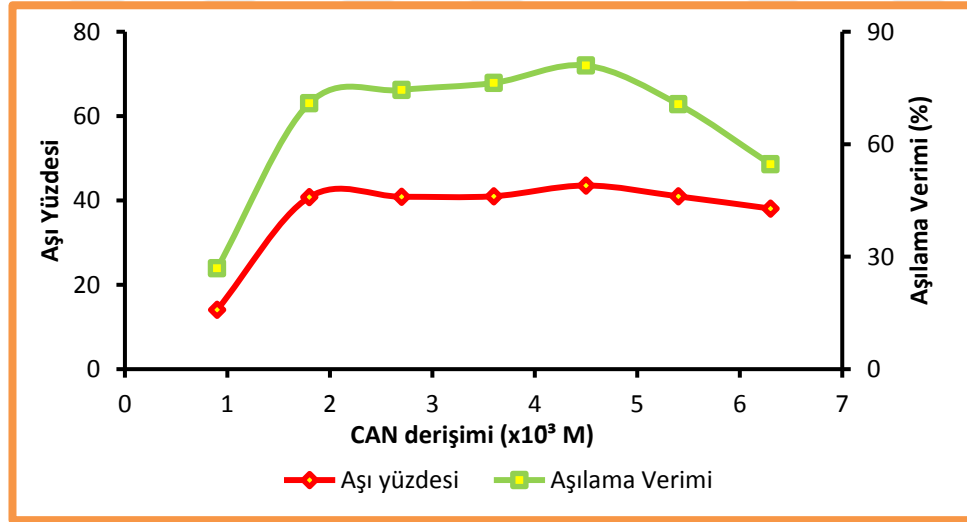
3.3.4. Aşılama Üzerine CAN Derişimi Etkisi

Aşılama üzerine CAN derişimi etkisi $8,99 \times 10^{-4}$ ve $6,3 \times 10^{-3}$ M arasında incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.20’de sunulmuştur. En yüksek aşı yüzdesi (% 43) ve aşılama

verimine (% 81) $4,5 \times 10^{-3}$ M CAN derişiminde ulaşılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi belli bir derişime kadar artma sonrasında azalma meydana gelmiştir. Tepkime ortamındaki CAN derişimindeki artış ile ortamda daha fazla yükseltgenme indirgenme tepkimesi gerçekleşecektir. Ortamdaki başlatıcı derişiminin artırılması ile pektin üzerindeki aktif merkez sayısı artacağından kopolimerleşmeyi de olumlu yönde etkilemiştir. Böylelikle pektin üzerine daha fazla monomer bağlanacağından aşı veriminin başlatıcı derişimi ile arttığı düşünülmüştür. Yüksek CAN derişiminde homopolimerizasyon ve sonlanma reaksiyon hızları kopolimerizasyon hızından daha yüksek olacaktır. Bunun sonucunda $4,5 \times 10^{-3}$ M CAN derişimden sonra aşı yüzdesi ve aşılama verimi azalacaktır. Literatürde de benzer sonuçlara rastlanmıştır [86, 87]. Şekil 3.19'da pektin-CAN mekanizması verilmiştir.



Şekil 3.19. Pektin CAN mekanizması

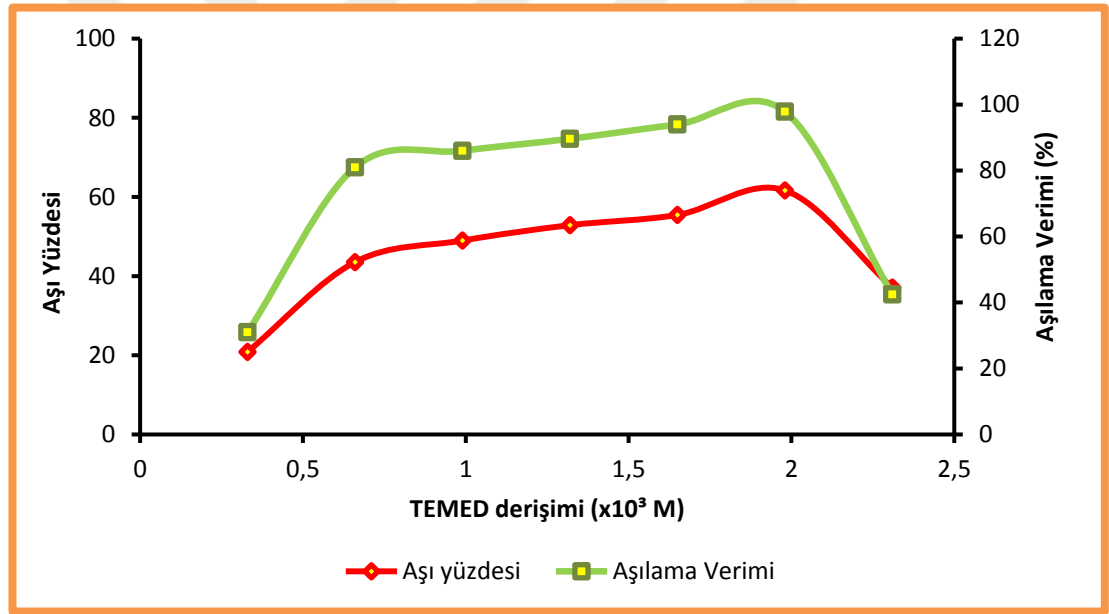


Şekil 3.20. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine CAN derişimi etkisi

Çalışma Koşulları: $t=4$ saat, $T=35$ °C, $[DEAAm]=0,146$ M, $[TEMED]=6,6 \times 10^{-4}$ M, $[HNO_3]=0,0397$ M, $[Pektin]=2$ g/dL, MG=1200 Watt

3.3.5. Aşılama Üzerine TEMED Derişimi Etkisi

Şekil 3.21’de TEMED derişiminin aşılama parametreleri üzerine etkileri incelendi. TEMED derişimi $0,33-2,31 \times 10^{-3}$ M aralığında çalışıldı. Şekil incelendiğinde TEMED derişiminin $1,98 \times 10^{-3}$ M’a kadar artması ile aşılama parametrelerinde artma gözlenmiştir. TEMED miktarının artmasının katalizör görevi görüp başlatıcının indirgenmesini artırdığı ve böylelikle de polimer üzerinden H çıkışı ile aktif merkez sayısının arttığı düşünölmüştür. Ancak yüksek TEMED derişiminde aşılama tepkimesi ile yarışmalı olarak yürüyen homo polimerleşme tepkimesi ve sonlanma tepkimeleri arttığı için aşı yüzdesi ve aşılama veriminde azalma gözlenmiştir. Çalışma sonucunda optimum TEMED derişimi $1,98 \times 10^{-3}$ M olarak alınmıştır. Bu derişimde aşı yüzdesi 62 ve aşılama verimi % 98 olarak bulunmuştur.

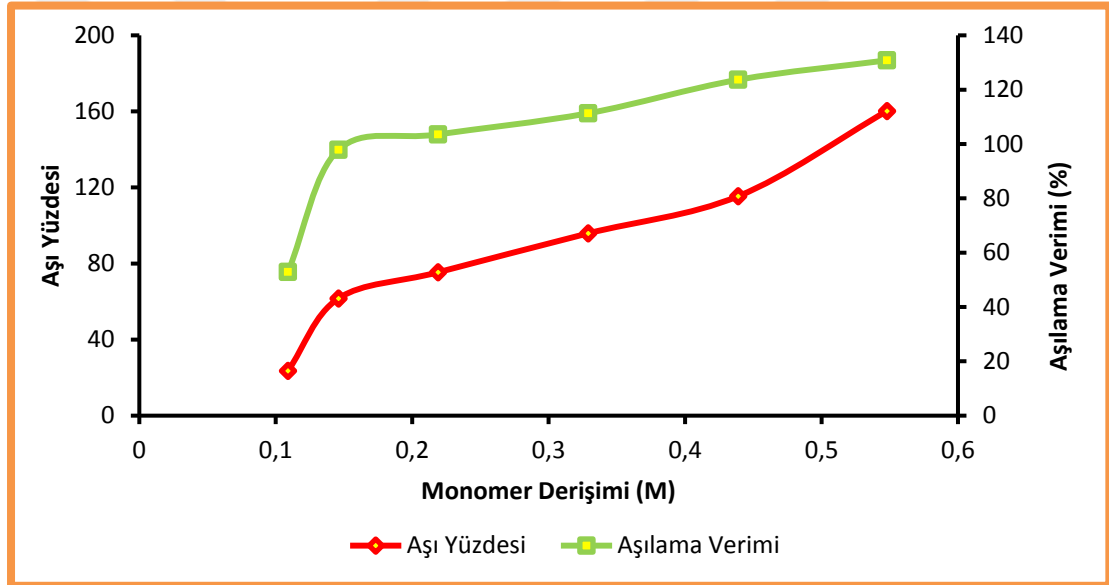


Şekil 3.21. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine TEMED derişim etkisi

Çalışma Koşulları: $t=4$ saat, $T=35$ °C, $[CAN]=4,5 \times 10^{-3}$ M, $[DEAAM]=0,146$ M, $[HNO_3]=0,0397$ M, $[Pektin]=2$ g/dL, MG=1200 Watt

3.3.6. Aşılama Üzerine Monomer Derişimi Etkisi

Aşılama üzerine DEAAM derişiminin etkisi 0,109 – 0,548 M aralığında diğer parametreler sabit tutularak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.22’de verilmiştir. Aşı yüzdesi ve aşı verimi monomer derişimi ile sürekli artış göstermektedir. Düşük monomer derişiminde pektin içerisine difüzlenen monomer miktarı az olacağından aşı yüzdesi ve aşı verimi düşük çıkmıştır. Şekilden aşı yüzdesinin monomer derişimi ile arttığı gözlemlendi. En yüksek aşı yüzdesi 160 ve aşılama verimi de % 130 olarak 0,548 M DEAAM derişiminde bulundu. Monomer derişiminin artması ile ortamda oluşan monomerik serbest radikal sayısının arttığı düşünüldü. Böylelikle bu merkezlere bağlanan monomer sayısı artmış ve bu da aşılama parametrelerinin artmasını sağlamıştır [88].



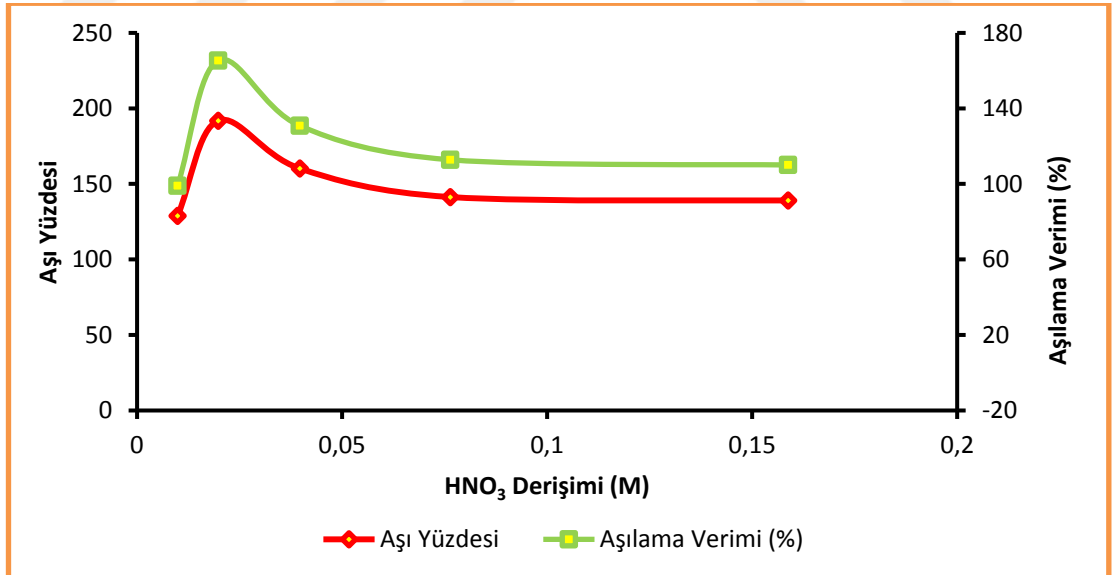
Şekil 3.22. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine monomer derişim etkisi

Çalışma Koşulları: t=4saat, T=35 °C, [CAN]=4,5x10⁻³ M, [TEMED]=1,98x10⁻³ M, [HNO₃]=0,0397 M, [Pektin]=2 g/dL, MG=1200 Watt

3.3.7. Aşılama Üzerine HNO₃ Derişim Etkisi

Şekil 3.23’de nitrik asit (HNO₃) derişiminin aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine etkileri incelendi. Nitrik asit derişimi $9,9 \times 10^{-3}$ - $1,59 \times 10^{-1}$ M aralığında çalışıldı. Şekil 3.23 incelendiğinde, nitrik asit derişiminin 0,020 M’a kadar artması ile aşılama yüzdesi ve veriminde artma, daha fazla asit derişimi ile aşı yüzdesi ve aşılama veriminde azalma gözlenmiştir. Nitrik asit derişiminin artmasının katalizör görevi görüp başlatıcının indirgenmesini artırdığı ve böylelikle de polimer üzerinden H çıkışı ile aktif merkez sayısının arttığı düşünölmüştür. Ancak yüksek asit derişiminde aşılama tepkimesi ile yarışmalı olarak yürüyen homopolimerleşme tepkimesi ve sonlanma tepkimeleri arttığı için aşı yüzdesi ve aşılama veriminde azalma gözlenmiştir. Çalışma sonucunda optimum nitrik asit derişimi 0,020 M olarak alınmıştır.

Benzer eğilimlere Trivedi çalışmasında sentezlediğı kısmen karboksimetillenmiş guar gum’a bu başlatıcı sistemi kullanarak metil metakrilatın aşılama ve optimizasyon çalışmasında da rastlanılmıştır. Bu çalışmada da nitrik asit derişiminin 0,2 M’a artması ile aşı verimi % 310’a kadar artmış daha sonra azalma göstermiştir [89, 90].

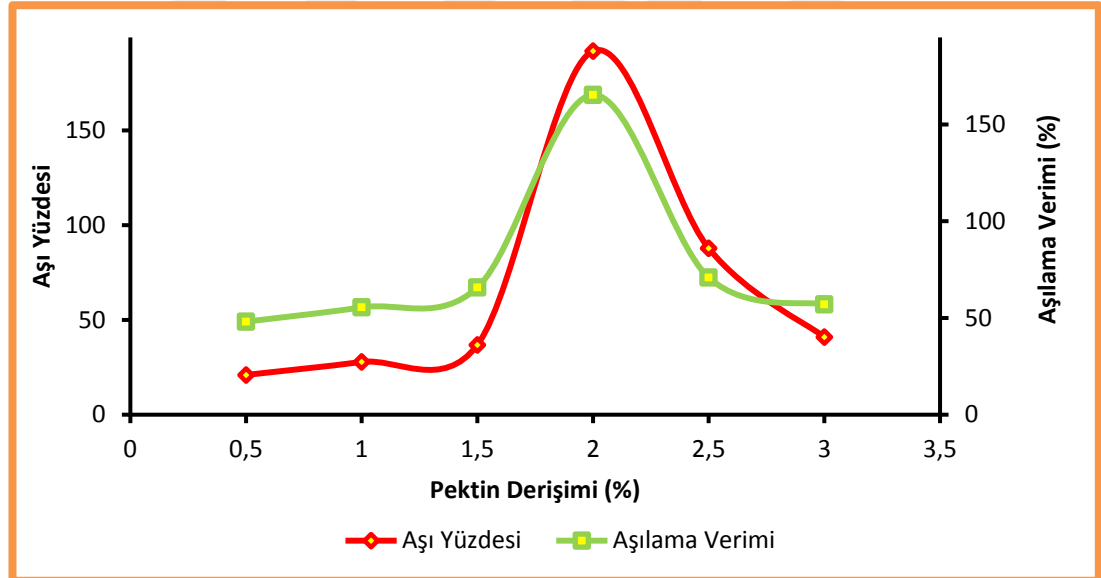


Şekil 3.23. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine nitrik asit derişim etkisi

Çalışma Koşulları: t=4saat, T=35 °C, [CAN]= $4,5 \times 10^{-3}$ M, [TEMED]= $1,98 \times 10^{-3}$ M, [DEAAm]=0,548 M, [Pektin]=2 g/dL, MG=1200 Watt

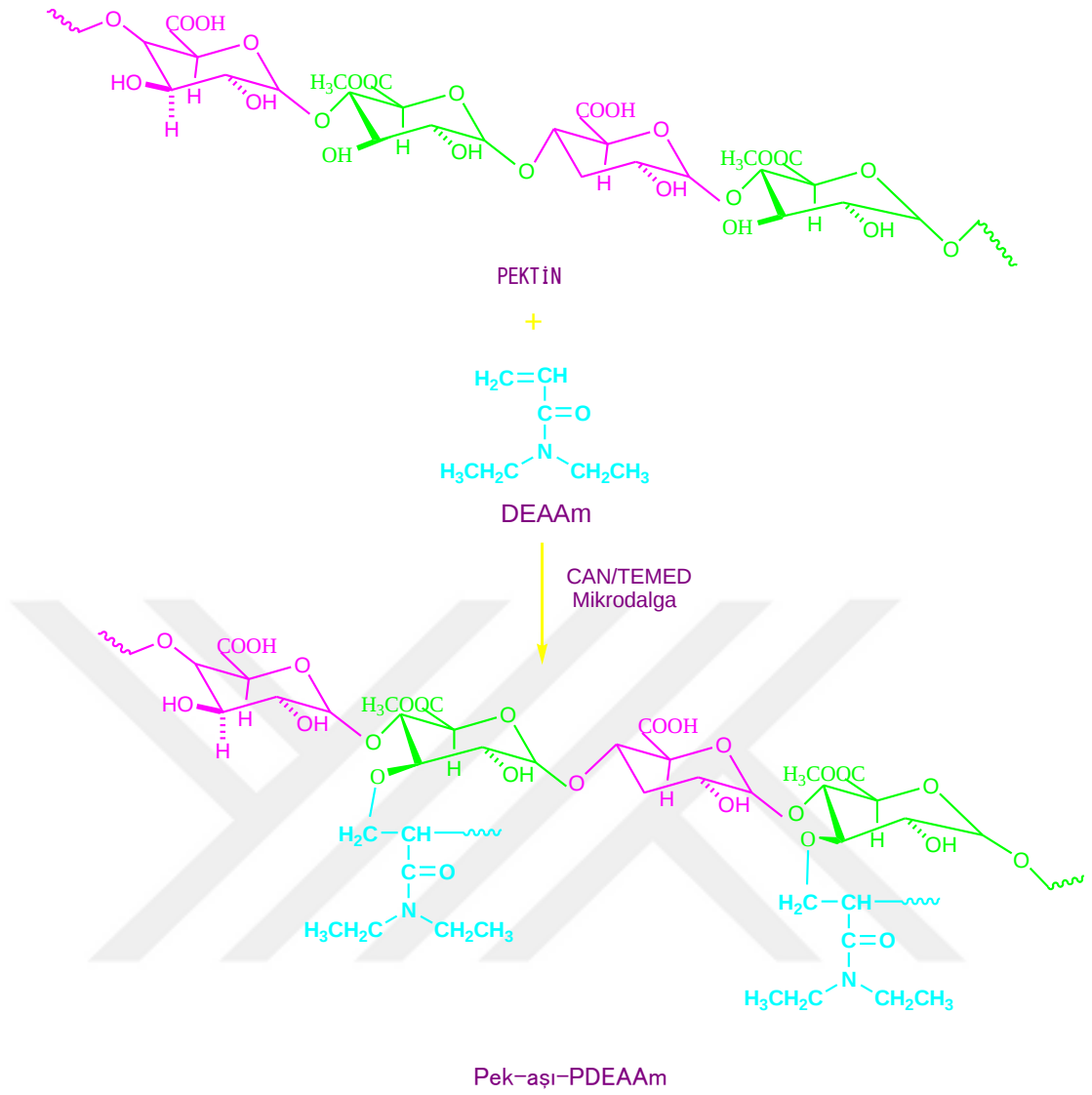
3.3.8. Aşılama Üzerine Pektin Derişimi Etkisi

Optimizasyon bölümünde aşılama etkin bir diğer parametre pektin yüzdesidir. Bu amaçla pektin yüzdesinin aşılama parametreleri üzerine etkisini görmek için diğer parametreler sabit tutularak pektin yüzdesi 0,5- 3 g/dL aralığında değiştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.24 de verildi. Şekil 3.24 incelendiğinde aşılama yüzdesi ve veriminin pektin yüzdesinin 2 g/dL'ye kadar artması ile arttığı bu değerden sonra azaldığı gözlemlendi. Pektin derişimi arttıkça oluşan makromolekül sayısının artmasına atfedilebilir. Aşılama parametrelerinin pektin yüzdesi ile azalması; polimer yüzdesinin artması ile çözelti vizkozitesinin artması ve buna bağlı olarak monomer ile başlatıcı radikallerinin difüzyonunun zorlaşmasına atfedilebilir. Böylelikle pektin birimleri üzerinde daha az sayıda aktif merkez oluşacak ve aşılama yüzdesi ve verimi düşecektir. Ayrıca başlatıcının difüzlenmesinin zorlaşması ile sonlanma reaksiyonlarının arttığı düşünülmüştür. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanılmıştır [91].



Şekil 3.24. Aşı yüzdesi ve aşılama verimi üzerine pektin yüzdesinin etkisi

Çalışma Koşulları: $t=4\text{ saat}$, $T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{CAN}]=4,5 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{TEMED}]=1,98 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{HNO}_3]=0,02\text{ M}$, $[\text{DEAAM}]=0,548\text{ M}$, $\text{MG}=1200\text{ Watt}$



Şekil 3.25. Pek-aşı-PDEAAm kimyasal yapısı

Aşı kopolimer yapısı Şekil 3.25’de sunulmuştur. Optimum koşullar: $t=4\text{ saat}$, $T=35\text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{CAN}]=4,5 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{TEMED}]=1,98 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{Pektin}]=2\text{ g/dL}$, $[\text{DEAAm}]=0,548\text{ M}$, $[\text{HNO}_3]\text{ MG}=1200\text{ Watt}$ olarak bulunmuştur.

Bu koşullarda en yüksek aşı yüzdesi ve aşılama verimi sırasıyla % 191 ve % 165 olarak elde edilmiştir.

3.4. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinden 5 Fluorourasil Salım Çalışması

3.4.1. Hazırlanan Mikrokürelerin Çap ve Tutuklanma Verim Değerleri

Hazırlanan pektin ve Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin çapları, tutuklanma verimleri ve hazırlanma koşulları Çizelge 3.6'da verilmiştir. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin aşı yüzdesi % 14'den % 75'e artmasıyla mikroküre çaplarının 0,786 mm'den 1mm'ye arttığı görülmüştür. Çap oranının artmasıyla yapıya giren DEAAm miktarının artış gösterdiği görülmektedir. İlaç/polimer oranının 1/4'den 2/1'e artması ile mikroküre çaplarının 0,87'den 1,204 mm'ye arttığı belirlenmiştir. i/p oranının artışı ile mikroküre içine giren 5-FU miktarının arttığı, buna bağlı olarak çap oranında artış gözlemlendiği düşünülmektedir. Kitosan derişiminin 0,25 M'dan 1 M'a artmasıyla mikroküre çaplarının 0,81'den 1,008 mm'ye arttığı belirlenmiştir. Kitosan miktarının artmasıyla mikroküreye kaplanan miktar da artmış ve bu da mikroküre çapını artırmıştır. Mikrokürelerde çapraz bağlayıcı derişiminin 0,5 M'dan 2 M'a artmasıyla mikroküre çaplarının azaldığı ve çapraz bağlanma süresinin 15 dakikadan 120 dakikaya artmasıyla mikroküre çaplarının 1,103 mm'den 0,89 mm'ye azaldığı gözlenmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarı ve çapraz bağlanma süresi arttıkça daha sıkı bir ağ yapısından kaynaklanan çap azalması meydana gelmektedir.

Tutuklanma verim değerleri Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinde aşı yüzdesinin artmasıyla azaldığı gözlenmiştir. İlaç/polimer oranının 1/4'den 2/1'e artmasıyla TV % 23'den %73'e arttığı bulunmuştur. Kitosan derişiminin artmasıyla TV'inde belirgin bir artış olmasa da aktifleşen kitosan miktarının artışıyla tutuklanma veriminde az da olsa artış gözlenmiştir. Bağlanan $ZnCl_2$ derişimi arttıkça mikroküre içine tutuklanan ilaç miktarının daha fazla olmasından dolayı tutuklanma verimi artmaktadır. Çapraz bağlanma süresi artışı tutuklanma verimini azaltmakta olduğu görülmüştür. Mikroküreler karşılaştırıldığında çapraz bağlanma süresi az olan mikrokürelerde daha az 5-FU kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle tutuklanma verimi süre artışıyla azalmaktadır.

Çizelge 3.6. İlaçlı mikrokürelerin hazırlanma koşulları, çap ve tutuklanma verim değerleri (Tüm mikroküreler 0,1 M NaOH derişiminde hazırlanmıştır.)

Simge	Adı	Aşı Yüzdesi	İ/P oranı	Kitosan(M)	ZnCl ₂ (M)	Süre(dk)	Çap(mm)	%TV
P0	Pectin	-	/1	0,5	0,5	30	0,786±0,061	90,01±0,04
P1	Pec-g- PDEAAm ₁	14	1/1	0,5	0,5	30	0,793±0,045	71,04±0,02
P2	Pec-g- PDEAAm ₂	22	1/1	0,5	0,5	30	0,795±0,019	65,07±0,03
P3	Pec-g- PDEAAm ₃	34	1/1	0,5	0,5	30	0,804±0,047	60,08±0,05
P4	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,5	0,5	30	0,824±0,031	57,05±0,01
P5	Pec-g- PDEAAm ₅	75	1/1	0,5	0,5	30	0,851±0,049	43,06±0,06
PD ₁	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/4	0,5	0,5	30	0,987±0,043	23,11±0,08
PD ₂	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/2	0,5	0,5	30	1,013±0,012	47,34±0,04
PD ₃	Pec-g- PDEAAm ₄	56	2/1	0,5	0,5	30	1,204±0,020	72,98±0,01
PC ₁	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,25	0,5	30	0,881±0,009	55,04±0,02
PC ₂	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	0,5	30	0,890±0,016	57,13±0,02
PC ₃	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	1	0,5	30	1,008±0,073	59,76±0,05
PZ ₁	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	1	30	0,877±0,031	61,54±0,02
PZ ₂	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	1,5	30	0,896±0,010	65,98±0,03
PZ ₃	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	2	30	0,902±0,042	67,08±0,02
PM ₁	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	1	15	1,103±0,019	74,05±0,04
PM ₂	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	1	60	0,978±0,034	52,01±0,01
PM ₃	Pec-g- PDEAAm ₄	56	1/1	0,75	1	120	0,889±0,018	34,07±0,01

3.4.2. Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinin FTIR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

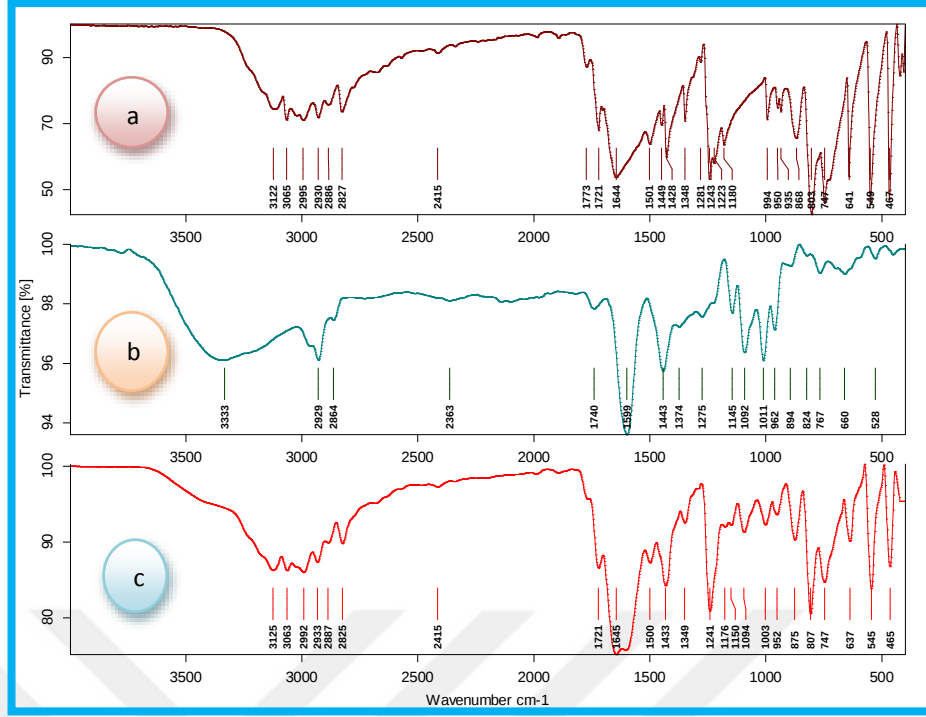
Şekil 3.26'da 5-FU, 5-FU yüklü Pek-aşı-PDEAAm ve boş Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin FTIR spektrumu görülmektedir. Pek-aşı-PDEAAm kopolimerinden elde edilen boş mikroküre spektrumu incelendiğinde; 3333 cm^{-1} 'de --OH ve kitosandaki --NH gerilme titreşiminin, $2929, 2864\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H gerilme titreşiminin, $1740, 1599\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O gerilme titreşimi görülmektedir. Çapraz bağlanmayla C=O gerilmesinin 1629 cm^{-1} 'den 1599 cm^{-1} dalga sayısına kaydığı görülmektedir. Spektrumlardaki farklılıkların nedeni kopolimer ile oluşturulan mikrokürelerin kitosan ile kaplanmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kitosana ait piklerde pektin ve Pek-aşı-PDEAAm'ye benzer yerlerde görülmektedir. Kitosanın FTIR spektrumunda, 3262 cm^{-1} 'de gözlenen geniş bant N-H gerilmesine, 3295 cm^{-1} 'de gözlenen bandın OH gerilmesine ait olduğu belirlenmiştir [92]. 2873 ve 1375 cm^{-1} 'deki piklerin sırasıyla -CH gerilmesini ve -CH₃'ün simetrik deformasyonunu, 1590 cm^{-1} 'deki bandın amin gruplarına ait N-H gerilme titreşimlerini, 1307 cm^{-1} 'deki bandın O-H eğilmesine ait olduğu belirlenmiştir. 1080 cm^{-1} 'de gözlenen bantların eter gruplarının C-O gerilmelerine ait olduğu belirlenmiştir [92].

Çizelge 3.7'de 5-FU, Kitosan, Pek-aşı-PDEAAm boş ve ilaçlı mikrokürelerinin FTIR sonuçlarının açıklamaları verilmiştir. FTIR spektrum verileri incelendiğinde serbest 5-FU ile ilaç yüklü mikrokürelerdeki titreşimlerin aynı yerde çıkması 5-FU kanser ilacının hazırlanan mikroküreler içerisinde kristal yapısında bulunduğunu göstermektedir. Literatürde benzer sonuçlar rapor edilmiştir [92, 93, 94, 95].

Çizelge 3.7. 5-FU, Kitosan, Pek-aşı-PDEAAm boş ve ilaçlı mikrokürelerinin FTIR sonuçları

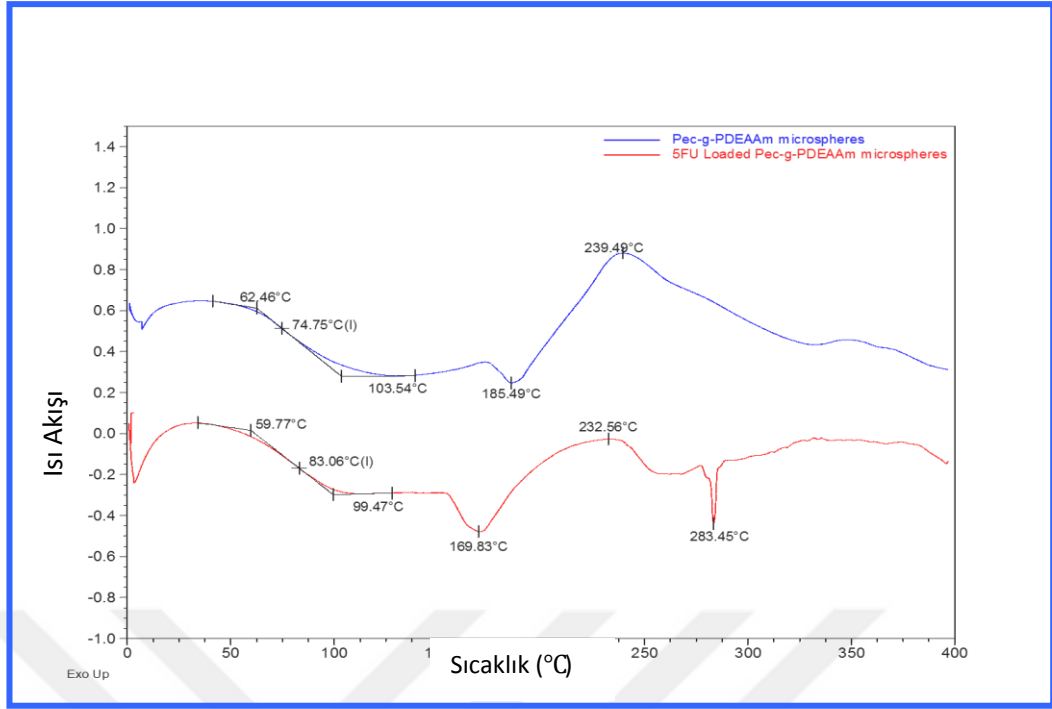
Polimer	cm ⁻¹	Açıklaması
5-Fluorourasil	3500-3122	Aromatik –CH gerilme titreşimi
	1721	N-H gerilme titreşimi
	1644	C=O gerilme titreşimi
	1449-1281	C-N gerilme titreşimi
	1243	C-H düzlem içi gerilme titreşimi
	1180	C-F titreşim titreşimi
	802	C-H düzlem dışı gerilme titreşimi
Pek-aşı-PDEAAm boş mikroküre	3333	-OH ve kitosandaki -NH gerilme titreşimi
	2929,2864	C-H gerilme titreşimi
	1740,1599	C=O gerilme titreşimi
Kitosan[92]	3262	N-H gerilme titreşimi
	2873	Alifatik C-H gerilme titreşimi
	1590	Amin gruplarına ait N-H gerilme titreşimi
	1375	-CH ₃ 'ün simetrik deformasyonu
	1307	O-H düzlem dışı eğilmesi
	1080	Eter gruplarının C-O gerilme titreşimi
Pek-aşı-PDEAAm 5-FU yüklü mikroküre	3125, 2825	5-FU'dan gelen C-H gerilme titreşimi
	2992, 2887	Pek-aşı-PDEAAm'den gelen C-H gerilme titreşimi
	1721, 1645	5-FU'dan gelen C=O gerilme titreşimi
	1433	C-N gerilme titreşimi
	1349	Kitosandan gelen CH ₃ grupları
	1241	5-FU kaynaklı C-H ve aşıdan gelen C-O-C gerilme titreşimi
	1160	Aşı kaynaklı C-N gerilmesi ve 5-FU'dan gelen C-F gerilme titreşimi



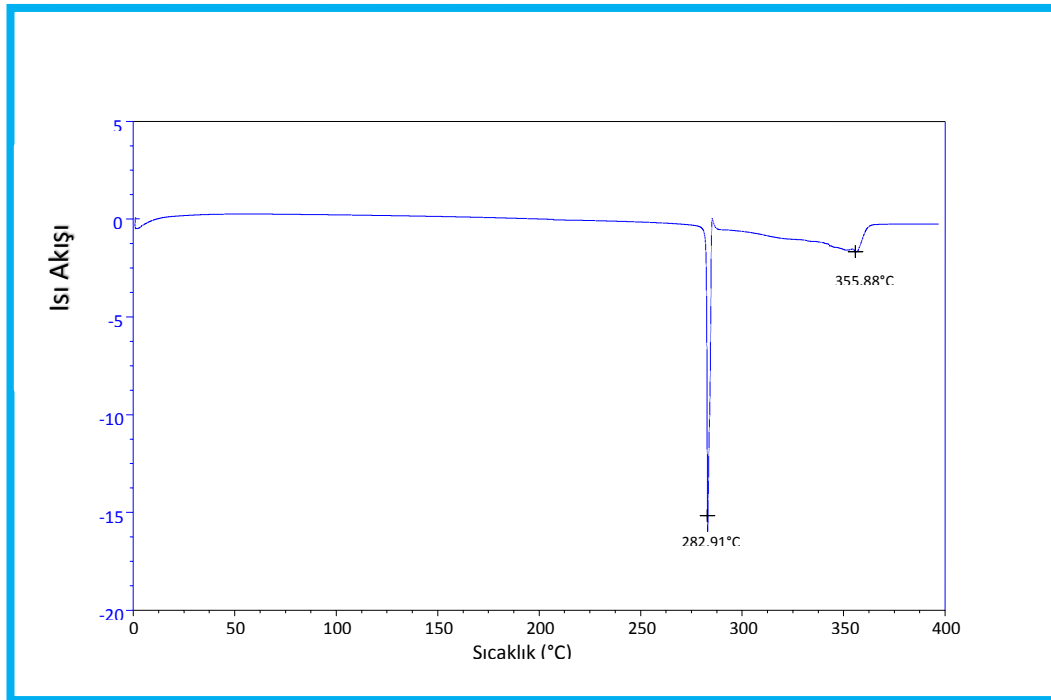
Şekil 3.26. 5-FU (a), Pek-aşı-PDEAAm boş mikroküre (b) ve 5-FU yüklü Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerin (c) FTIR spektrumları

3.4.3. 5-FU ve Pek-aşı-PDEAAm₄ Mikrokürelerin DSC Termogramınının Değerlendirilmesi

Şekil 3.27 ve 3.28’de 5-FU, % 56 aşı yüzdeli Pek-aşı-PDEAAm aşı kopolimerinden elde edilen P₄ formülasyonundaki ilaçlı ve boş mikrokürelerin DSC termogramı görülmektedir. DSC termogramlarından ilacın erime noktası 283 °C, P₄ formülasyonlu boş mikrokürelerin T_g değeri 74 °C ve P₄ formülasyonlu 5-FU yüklü mikrokürelerin T_g değeri 83 °C olarak bulunmuştur. Mikrokürelere ilaç yüklenmesiyle polimer ağının içerisindeki amorf bölgelerdeki serbest kısımlar ilaç kristalleriyle dolmaktadır. Bundan dolayı T_g değerinde artma görülmektedir. Ayrıca 5-Fluorourasilin erime piki 283 °C olarak ilaçlı mikrokürede de çıkması ilacın kristalin yapısını mikrokürede koruduğunu göstermektedir. Ayrıca ilaç yapısındaki F atomu ile aşı kopolimer yapısı ve kitosan yapısındaki N atomları arası etkileşimler olduğunu göstermektedir. T_g değerinin artmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da rapor edilmiştir [96, 97].



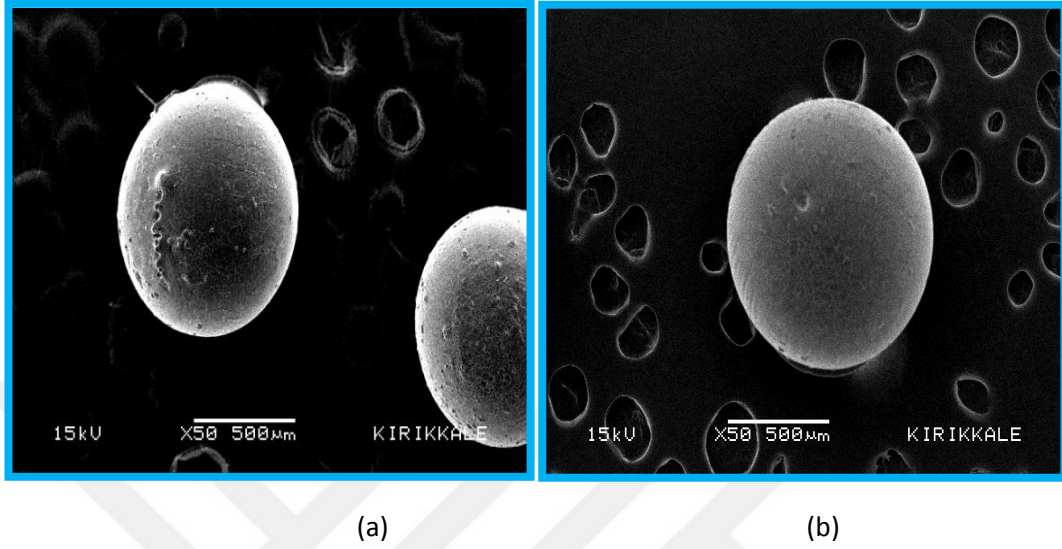
Şekil 3.27. Pek-aşı-PDEAAm4 ve (ilaçlı) Pek-aşı-PDEAAm4 mikrokürelerinin DSC termogramı



Şekil 3.28. 5-FU'in DSC termogramı

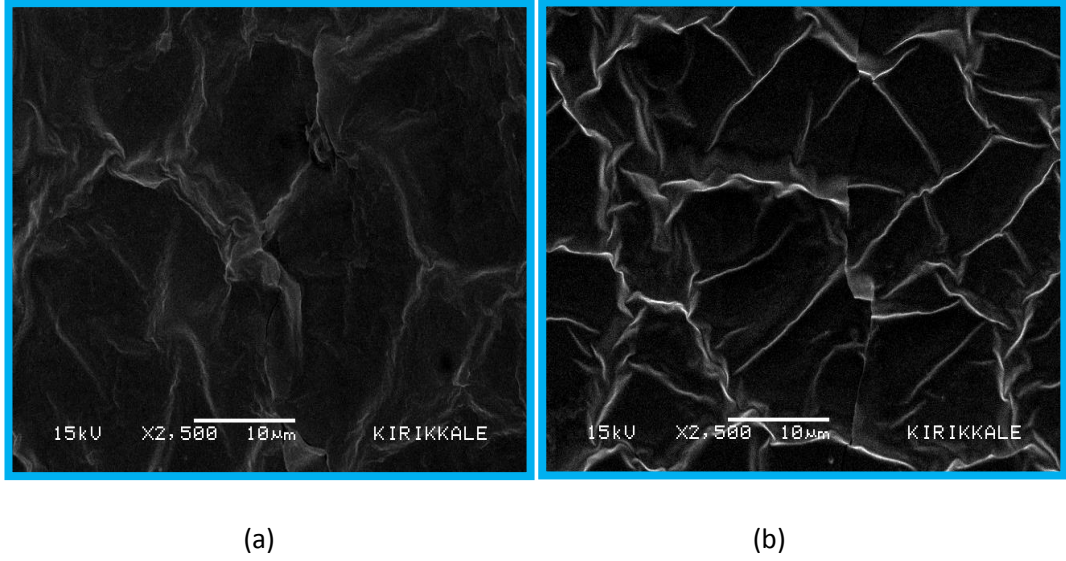
3.4.4. Hazırlanan Mikrokürelerin SEM Analizi

Şekil 3.29, 3.30, 3.31 ve 3.32’de farklı yapılarıdaki mikrokürelerin SEM fotoğrafları sunulmuştur.



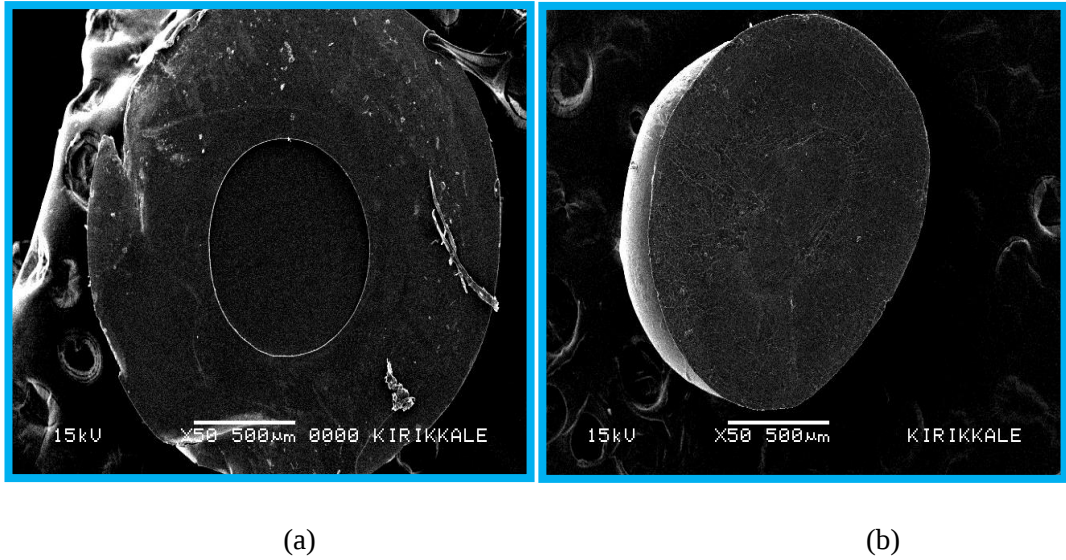
Şekil 3.29. (a) 50 büyütmeli boş pektin mikroküresi ve (b) 50 büyütmeli boş Pek-aşı-PDEAAm mikroküreleri SEM fotoğrafları

Şekil 3.29 incelendiğinde pektin yapısına PDEAAm eklenmesiyle küresel yapının korunduğu görülmektedir. Ayrıca pektin mikroküreleri ile Pek-aşı-PDEAAm₄ mikroküreleri yüzey pürüzlülükleri arasında fark görülmemektedir. Bunun nedeni olarak mikroküre yüzeylerinin kitosan ile kaplanmasına atfedilmektedir.



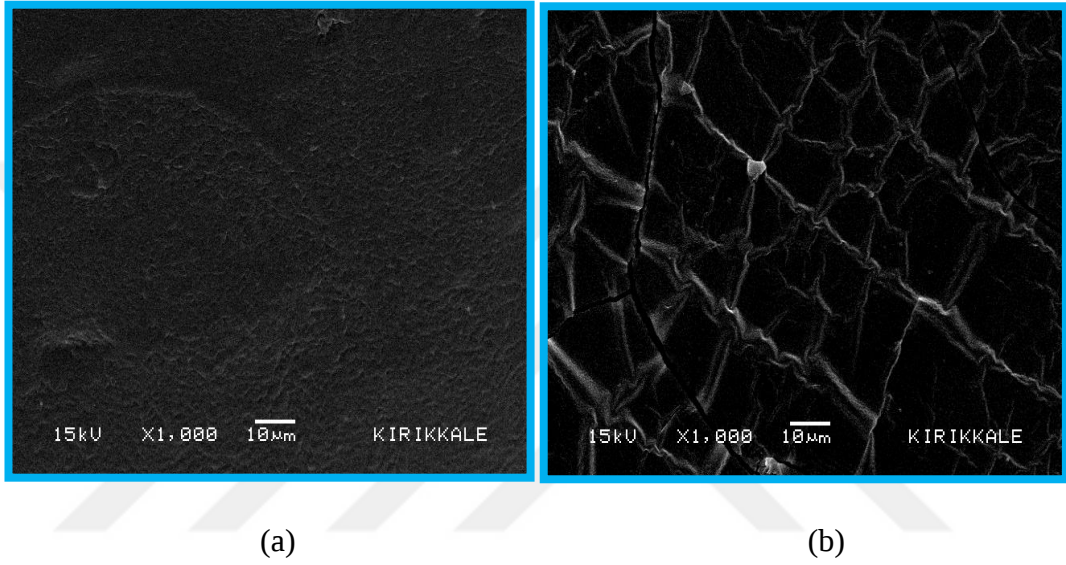
Şekil 3.30. (a) 2500 büyütme pektin ve (b) 2500 büyütme Pek-aşı-PDEAAm4 mikrokürelerinin SEM fotoğrafları

Şekil 3.30 incelendiğinde Pek-aşı-PDEAAm4 formülasyonundan elde edilen mikrokürelerin pektin mikroküresine göre daha sıkı ağ yapısına sahip olduğu görülmektedir. Ek olarak a'daki gözeneklerin b'ye göre daha geniş olması salım için daha fazla serbest hacminin olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.31. (a) 50 büyütme 5-FU yüklü Pek-aşı-PDEAAm4 mikroküre kesiti ve (b) 50 büyütme 5-FU yüklü Pek-aşı-PDEAAm1 mikrokürelerinin çapraz kesiti

Şekil 3.31 incelendiğinde % 14 verime sahip Pek-aşı-PDEAAm₁ mikroküre kesitinin % 56 verime sahip Pek-aşı-PDEAAm₄ mikrokürelerine göre daha az küreselliğe sahip olduğu görülmektedir. Aşı kopolimer verimi azaldıkça bağlanan grup sayısı azalmakta ve küresellikten uzaklaşmaktadır. Ayrıca yüzeyin kitosan kaplaması düşük verimli kürede tam anlamıyla net değildir. Bunun nedeni düşük verimde daha fazla gözeneklerden dolayı kitosan daha çok pektin yapılı mikroküre içine nüfuz etmesine atfedilmektedir.



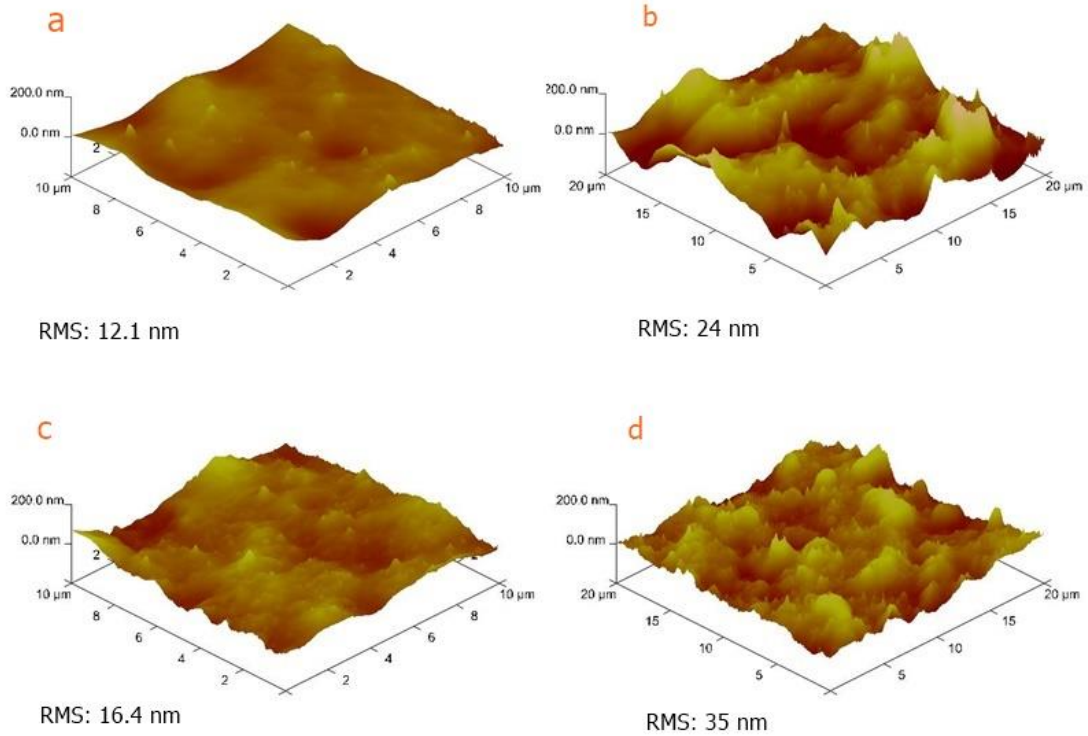
Şekil 3.32. (a) 1000 büyütmeli 2saat çapraz bağlı mikroküre ve (b) 1000 büyütmeli 30dk çapraz bağlı mikroküre SEM fotoğrafları

Şekil 3.32 incelendiğinde çapraz bağlanma süresi arttıkça daha sıkı ağ yapısında olduğu görülmektedir. Çapraz bağ süresinin artması ile gözeneklerin arasındaki boşlukların azalması ve kuruma esnasında suyun daha yavaş buharlaşması ile yapının daha sık olmasını sağladığı düşünülmektedir.

3.4.5. AFM Analiz Sonuçları

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) çok hassas bir yay ile yüzey arasındaki kuvvet etkileşimlerinden kaynaklanan sapmaları ölçmeye dayanan görüntüleme sistemidir. AFM görüntülerinden hesaplanan yüzey pürüzsüzlüğünün ölçüsü olan RMS (kök

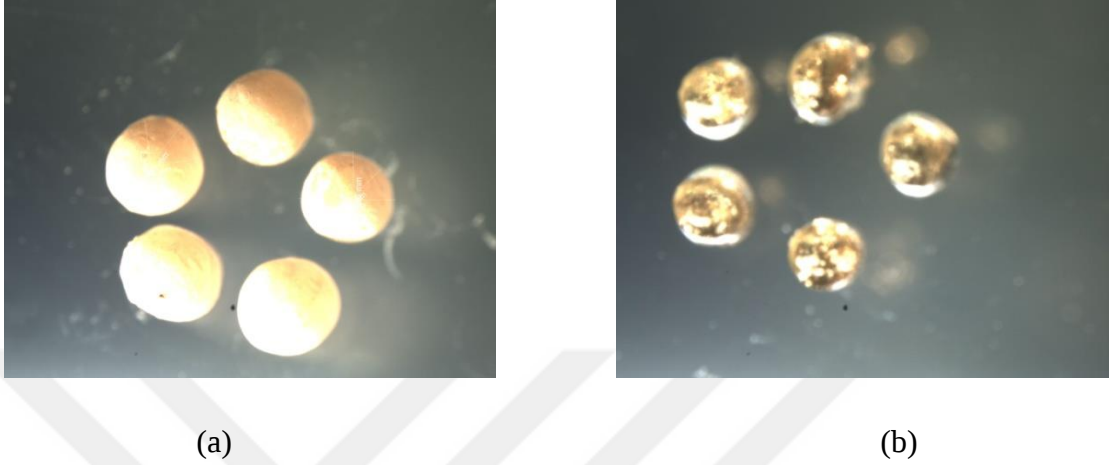
ortalama kare) değerlerine bakılmaktadır [98]. AFM ile ölçülen görüntüler % 56'lık aşı yüzdeli ve % 75'lik aşı kopolimerlerden elde edilen mikroküreler için Şekil 3.33'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerinin (a ve b) yüzeyinin düşük pürüzlülüğe sahip olduğu görülmektedir. % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerinin 100 μm^2 alanda ölçülen RMS değeri 12,1 nm bulunurken, 100 μm^2 alanda % 75'lik mikrokürelerde 16,4 nm olarak bulunmuştur. % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerinin 400 μm^2 alanda ölçülen RMS değeri 24 nm bulunurken, 400 μm^2 alanda % 75'lik mikrokürelerde 35 nm olarak bulunmuştur. Böylelikle % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerinin pürüzlülüğü % 75 aşı yüzdeli kopolimerlerin mikrokürelere göre daha az olduğu görülmektedir [97].



Şekil 3.33. % 56'lık aşı yüzdeli (a,b) ve %75 aşı yüzdeli (c,d) mikrokürelerin AFM görüntüsü

3.4.6. Hazırlanan Mikrokürelerin Optik Mikroskop Görüntüleri

Şekil 3.34’de sırasıyla P₄ formülasyonundaki 5-Fluorourasil yüklü mikrokürelerin ve P₄ formülasyonundaki boş mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri verilmiştir.

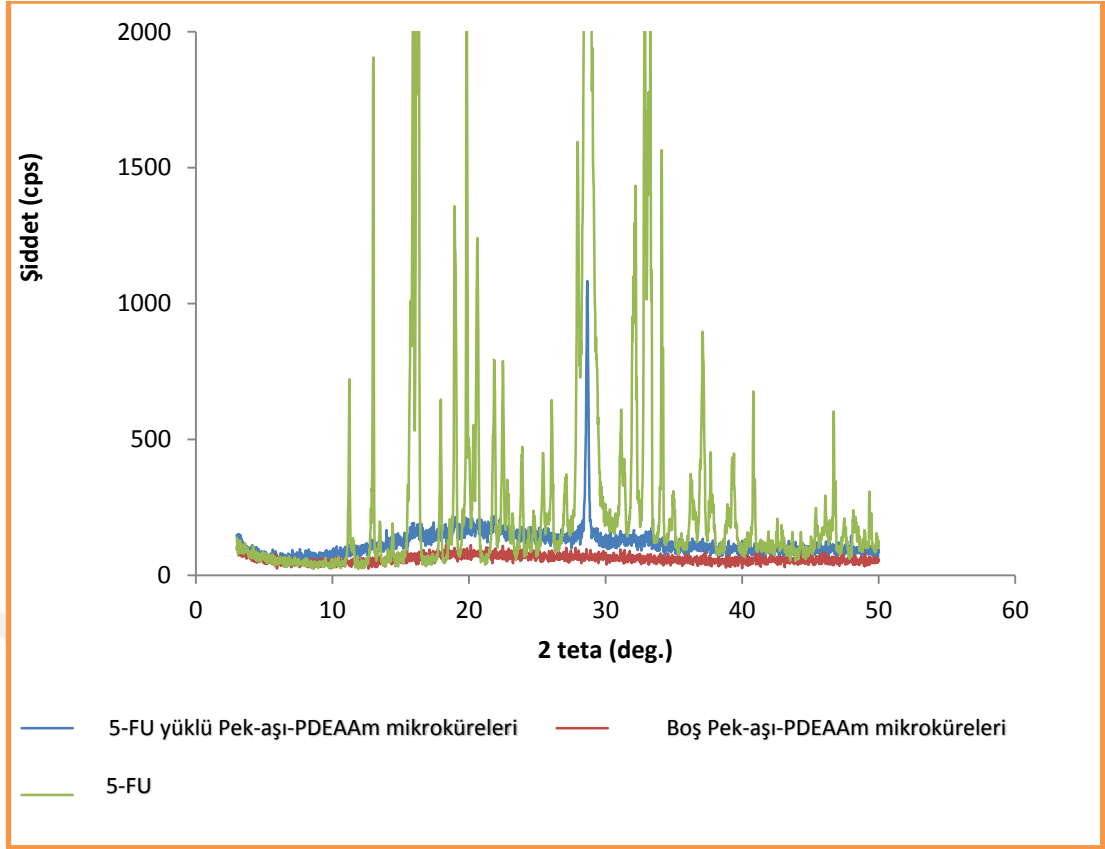


Şekil 3.34. Mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri a) %56 verimli ilaçlı mikroküre b) % 56 verimli boş mikroküre

Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde yapıya 5-FU girmesiyle küreselliğin arttığı gözlenmiştir. Boş mikrokürelerin daha küçük ve küresel formunun biraz azaldığı görülmektedir.

3.4.7. X-Işını Difraksiyonu (XRD)

XRD (X-ışını kırınımı) karakteristik X-ışınları kullanılarak gerçekleştirilen analiz yöntemidir. X-ışını kırınımı desenindeki pik pozisyonlarının (Θ), pik yarı genişliğinin belirlenmesi sonucunda mikrokürelerin kırılma ve dağılma verileri belirlenebilmektedir [99]. 5-FU, boş Pek-aşı-PDEAAm₄ ve ilaçlı Pek-aşı-PDEAAm₄ mikrokürelerinin kristal yapılarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen XRD sonuçları Şekil 3.35’de verilmiştir.



Şekil 3.35. 5-FU, boş Pek-aşı-PDEAAm₄, ilaçlı Pek-aşı-PDEAAm₄ Mikrokürelerin XRD Deseni

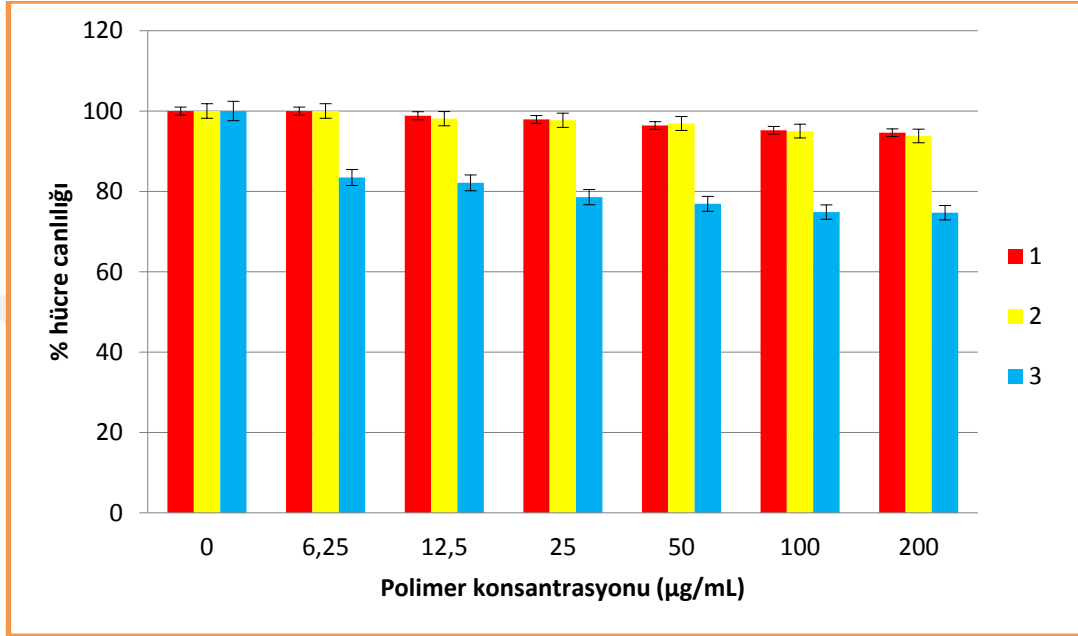
5-FU'nun XRD deseninde iki teta açıları $16,44^\circ$, $28,24^\circ$ ve $34,34^\circ$ değerleri ilacın kristalin yapısını göstermektedir.

Pek-aşı-PDEAAm₄ boş mikroküre yapısının amorf özellikte olduğu geniş yapısından görülmektedir. Boş mikrokürenin yayvan yapısında bulunan en belirgin pik $19,80^\circ$ olarak belirlenmiştir.

Pek-aşı-PDEAAm₄ ilaçlı mikrokürelerinde benzer yapıya sahip olduğu, bununla birlikte özellikle $28,34^\circ$ 'deki keskin 5-FU ait pikin çıkması ilacın kristal yapısını mikroküre içinde koruduğunu desteklemektedir. Ayrıca ilaçlı mikrokürelerde $12,98^\circ$, $16,24^\circ$, $19,80^\circ$, $28,34^\circ$, $32,34^\circ$ ve $40,84^\circ$ 'de keskin pikleri ölçülmüştür. Benzer sonuçlara literatürlerde rastlanmıştır [100].

3.4.8. Pek-aşı-PDEAAm aşı kopolimerin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerin MTT Sonuçları

Şekil 3.36’da pektin, % 56 verimli Pek-aşı-PDEAAm kopolimeri ve % 56 verimli Pek-aşı-PDEAAm mikroküresinin % canlılık değerleri sunulmuştur.

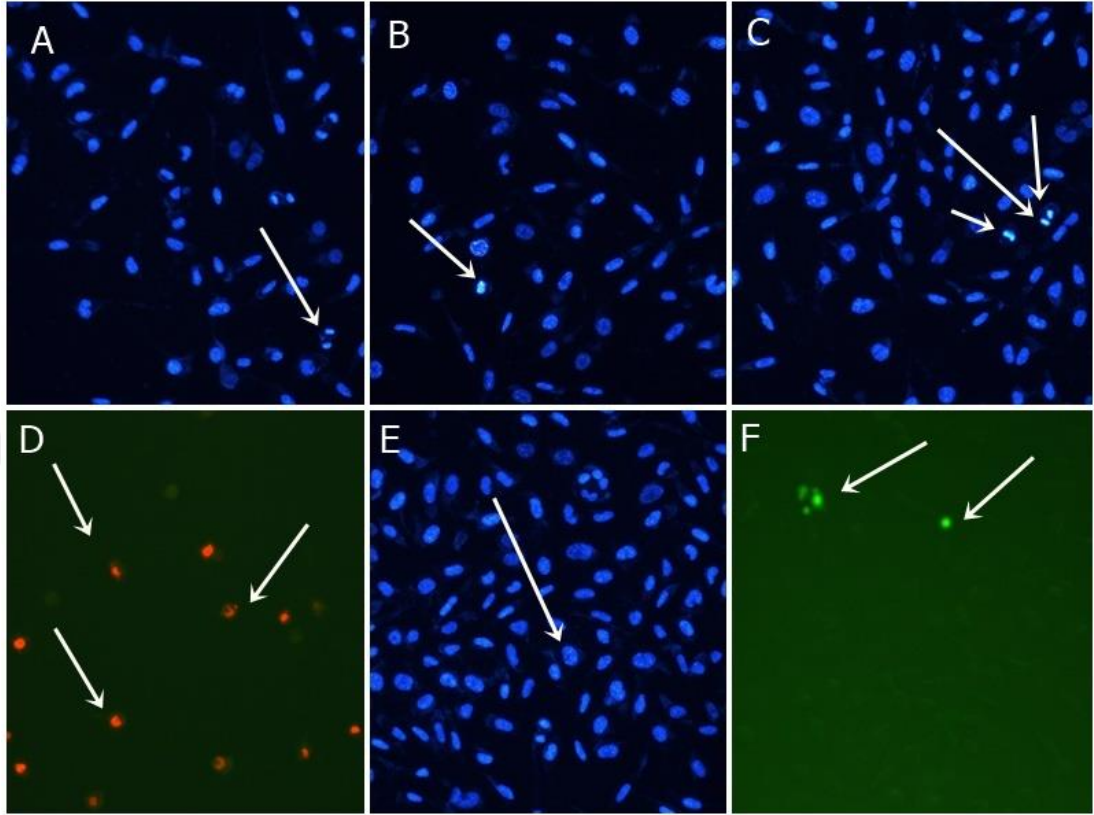


Şekil 3.36. Pektin (1), % 56 kopolimer (2) ve % 56 mikrokürenin (3) % hücre canlılığı-derişim değışimi

Şekil 3.36 incelendiğinde kontrol grubunda (0 µg/mL) toksisitenin olmadığı gözlenmiştir. Düşük derişimde (6.25 µg/mL) en yüksek hücre canlılığı pektin ve % 56 kopolimer örneklerine uygulandığı hücrelerde görülmüştür. Numune derişimi arttıkça % 56 mikroküre örneğinde hücre canlılığında azalma görülmektedir. En yüksek derişimde (200 µg/mL) pektin numune uygulandığı hücrelerdeki canlılık yaklaşık % 94, % 56 kopolimere uygulandığı hücrelerdeki canlılık yaklaşık % 93 iken, % 56 mikroküreye uygulandığı hücrelerdeki canlılık yaklaşık % 64 oranındadır.

Genel sonuç pektin, % 56 kopolimer ve % 56 mikroküre numunelerin düşük derişimler detoksik olmadığı (6,25; 12,5; 25 µg/mL), derişim miktarı arttıkça toksik etkinin biraz

arttığı, buna bağlı olarak % canlılık oranının (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) derişimlerde yüksek olduğu gözlenmiştir [101].



Şekil 3. 37. İkili boyama ile apoptotik ve nekrotik hücrelerin gösterilmesi

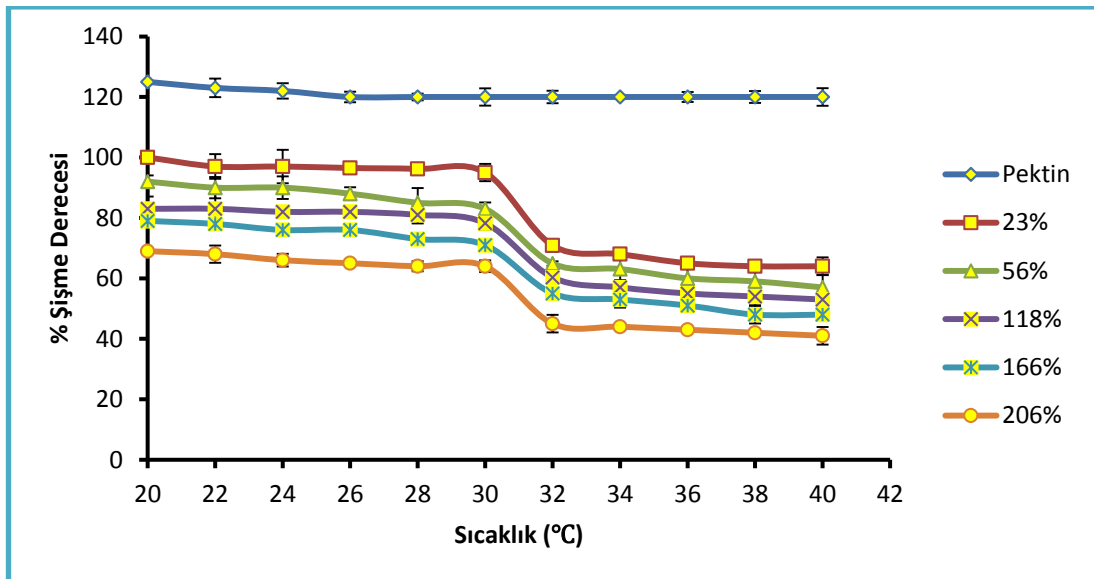
Pektin (A), % 56 aşı yüzdeli kopolimer (B), % 56 aşı yüzdesindeki kopolimerin mikroküresine ait apoptoz (C), nekroz (D) görüntüleri Şekil 3.37’de verilmiştir. Şekil 3.37 A’da, 12,5 $\mu\text{g/mL}$ derişimde pektine uygulanmış L929 fibroblast hücreleridir ve apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile parlak mavi renkte görölmektedir. Şekil 3.37 (B)’de, 100 $\mu\text{g/mL}$ % 56 aşı yüzdeli kopolimer uygulanmış L929 fibroblast hücreleridir, apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile parlak mavi renkte görölmekte ve DAPI filtresinde incelenmektedir. Şekil 3.37 (C)’de, 200 $\mu\text{g/mL}$ % 56 aşı yüzdeli kopolimer uygulanmış L929 fibroblast hücreleridir ve apoptotik hücreler Hoechst 33342 ile parlak mavi renkte görölmektedir. Şekil 3.37 (D)’de, 200 $\mu\text{g/mL}$ derişimde % 56 aşı yüzdeli mikroküre L929 fibroblast hücreleri olup kırmızı görünen hücreler propodiumiodide ile boyanmış, nekrotik hücrelerdir. Nekrotik hücreler FITC

filtresinde görülmektedir. Şekil 3.37 (E) ve (F), sadece medyum uygulanmış kontrol grubu hücreleridir. Bu şekildende örneklerin biyoyoumlu oldukları görülmektedir.

3.4.9. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerin LCST sonuçları

Pektin ve aşı kopolimer mikrokürelerinin LCST değerlerinin tespiti için sıcaklık-% şişme derecesi sonuçları Şekil 3.38’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde pektin mikrokürelerinin LCST değerinin olmadığı, aşı kopolimerlerden elde edilen mikrokürelerde PDEAAm’ye benzer şekilde LCST değerinin 31°C olduğu görülmektedir. Aşı kopolimer mikrokürelerinin şişmelerindeki azalma sıcaklığa duyarlı hale geldiğinin göstergesidir. Bu durum eklenen PDEAAm’dan kaynaklanmaktadır. Sıcaklık artması ile LCST değerlerinin üstünde polimer zincirlerinin hidrofobik etkileşimi artmaktadır. Buda geçirgenliğin 31 °C üzerinde azalmasına sebep olmuştur. Benzer sonuçlar literatürlerde belirtilmiştir [102].

Mikroküreler 31°C de LCST değeri verdiği ve LCST değerinin altındaki sıcaklıklarda yüksek şişme derecesi ve LCST değerinin üzerindeki sıcaklıklarda düşük şişme dereceleri verdiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlardan sentezlenen kopolimerlerin sıcaklığa duyarlı kopolimerler olduğu ve aşı yüzdesinin değişmesiyle LCST değerlerinin değişmediği görülmektedir.



Şekil 3.38. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin LCST şişme davranışları

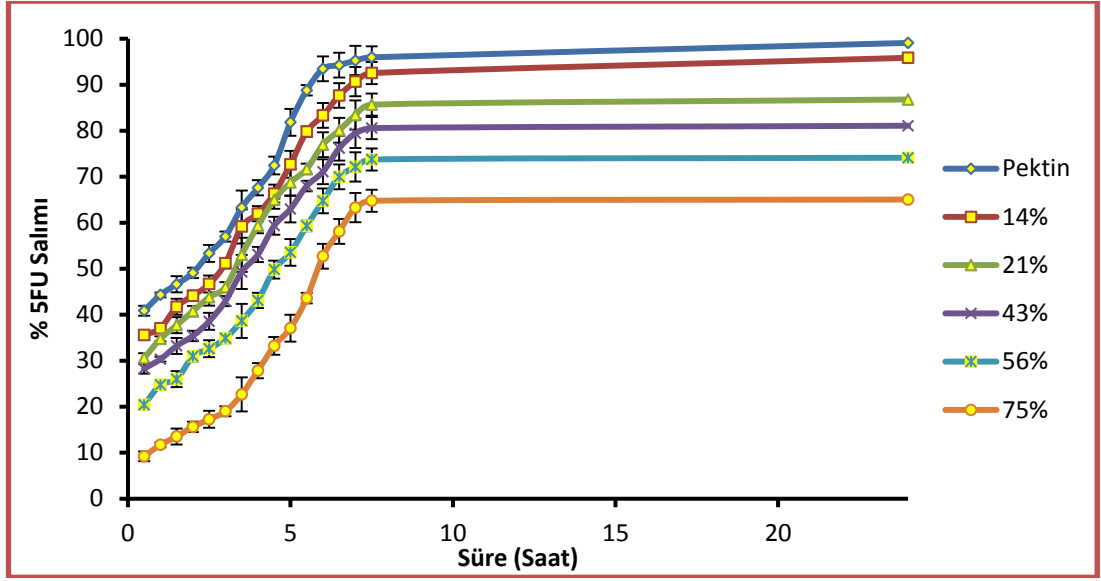
3.5. Pektin ve Pek-aşı-PDEAAm Mikrokürelerinden İlaç Salımı ve Şişme Çalışması

3.5.1. Aşı Yüzdesinin 5-FU Salıma ve Şişme Derecesine Etkisi

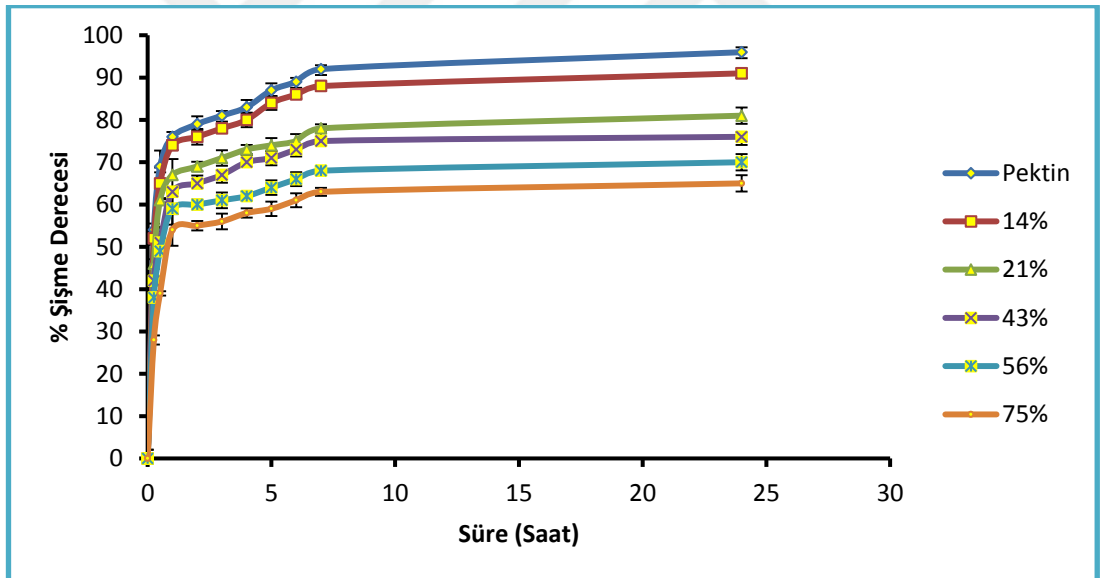
Pektin ve farklı yüzdelerdeki aşı kopolimerlerden mikroküreler hazırlanmış ve 5-FU salımına etkisi pH 7,4 ve 37 °C'de Şekil 3.39'da verilmiştir. Mikroküre hazırlamada 2 g/dL pektin (P₀), % 14 (P₁), % 21 (P₂), % 43 (P₃), % 56 (P₄) ve % 75 (P₅) aşı yüzdeli polimerler kullanılmıştır.

Pektin mikroküresi için 24 saat sonunda 5-FU salımı % 99 iken Pektin-aşı-PDEAAm mikroküreleri için (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅) sırasıyla % 96, % 87, % 81, % 74, % 64 olarak bulunmuştur. Bu sonucun yapıya katılan hidrofob karakterdeki PDEAAm zincirleri nedeniyle su moleküllerinin mikroküreler içerisine difüzyonunun azalması ve bundan dolayı ilacın daha yavaş difüzlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca salım sıcaklığı olan 37 °C LCST sıcaklığının üstündedir. Bu sıcaklıkta etil grupları arasındaki hidrofob etkileşimler, su-hidrofil gruplar arasındakine göre daha baskındır. Bundan dolayı mikrokürelerin şişmesi aşılama ve aşı yüzdesi ile azalarak daha az ilacın difüze olmasına sebep olur. Literatürlerde benzer sonuçları rapor edilmiştir [103, 104].

Şekil 3.40'da gösterilen pektin ve farklı yüzdelerdeki aşı kopolimerlerin şişme davranışı salım sonuçlarını destekler niteliktedir. Pektin ve Pektin-aşı-PDEAAm mikrokürelerinin şişme dereceleri karşılaştırıldığında aşılınmış polimerle elde edilen mikrokürelerin daha az şişme değerine sahip olduğu bulunmuştur. Bunun pektin yapısına aşılana PDEAAm gruplarının pektine göre daha hidrofobik olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Şekil 3.40 incelendiğinde 7 saatte mikrokürelerin denge şişmelerine ulaştıkları görülmektedir. Benzer sonuçlar literatürde rapor edilmiştir [105].



Şekil 3.39. Aşı yüzdesinin 5-FU salımına etkisi



Şekil 3.40. Aşı yüzdesinin şişme derecesine etkisi

3.5.2. Sıcaklığın 5-FU Salımına ve Şişme Derecesine Etki

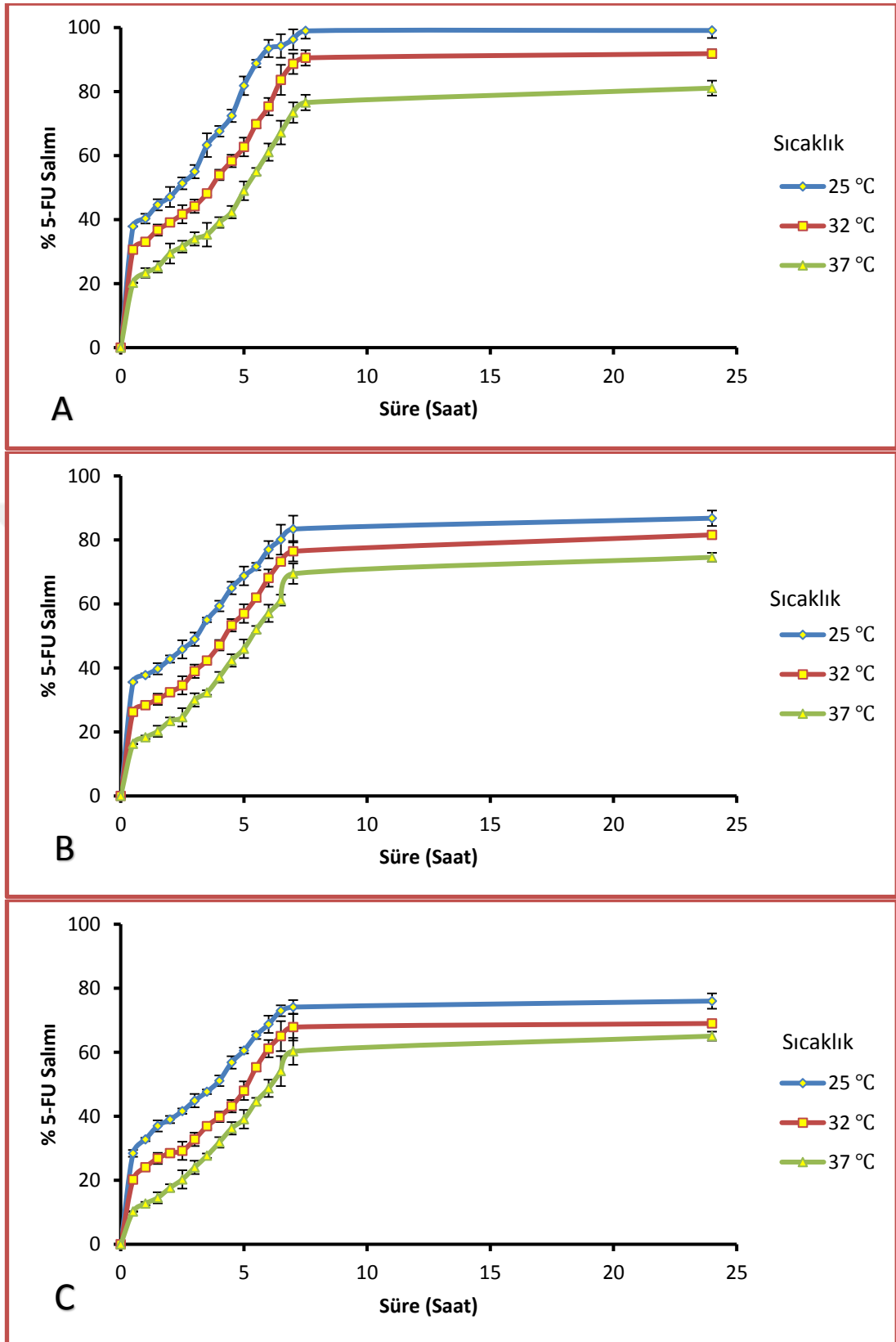
Farklı aşı yüzdeslerinde elde edilen mikrokürelerin 25, 32, 37 °C sıcaklıklarda pH 7,4 ortamında 5-FU salımı incelenmiştir. Bu aşama için üç farklı aşı yüzdesinden

yararlanılmıştır. Sıcaklığın etkisinde % 14 (P₁), % 56 (P₄), % 75 (P₅) aşı yüzdeli kopolimerlerden elde edilen mikroküreler tercih edilmiştir.

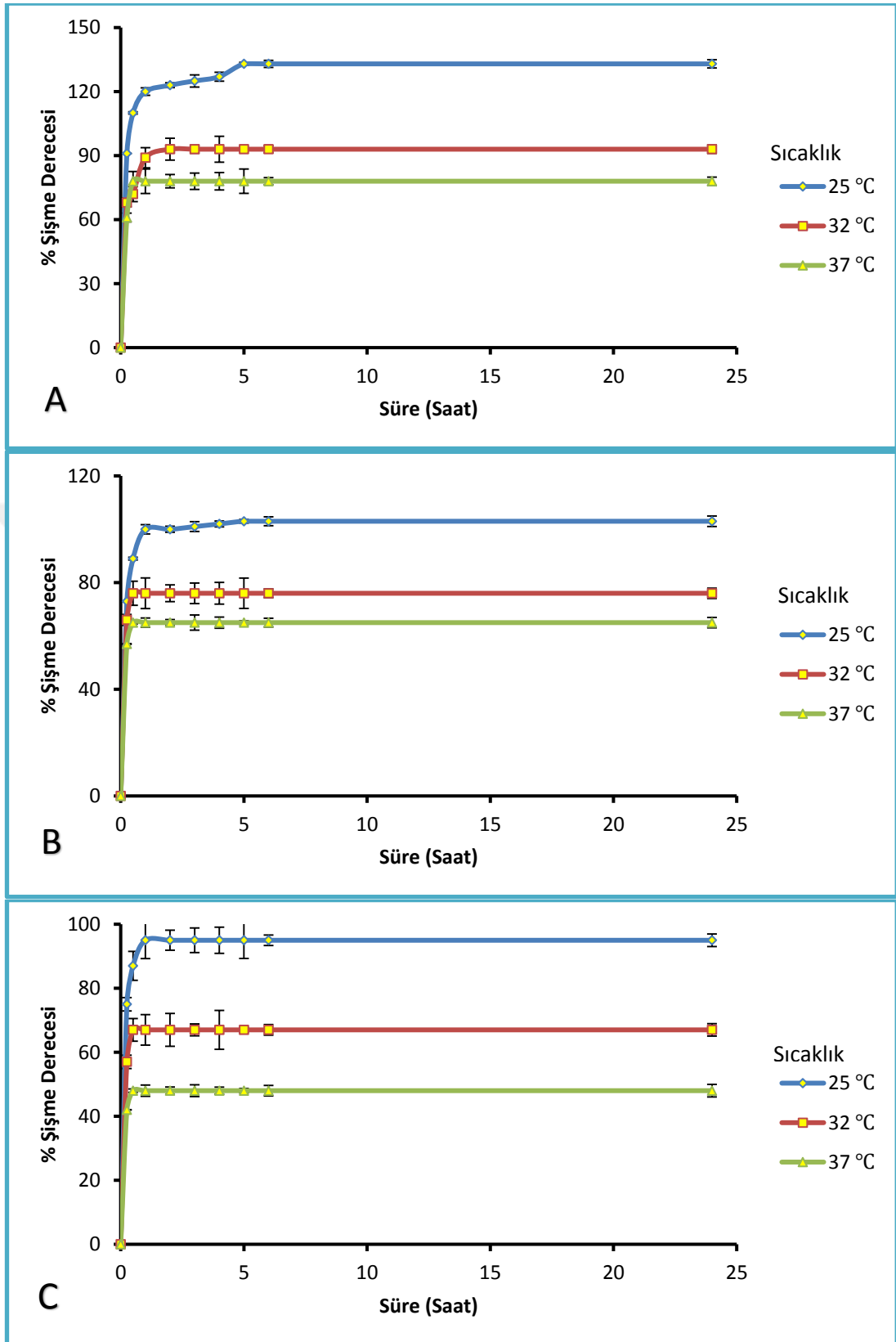
% 14 (P₁) verime sahip aşı kopolimer 24 saat sonunda 25, 32 ve 37 °C de sırasıyla % 99, % 93 ve % 81 5FU salımı gerçekleştirmiştir. % 56 (P₄) verime sahip aşı kopolimerik mikroküreleri 24 saat sonunda 25, 32 ve 37 °C de sırasıyla % 86, % 81 ve % 74 salım; % 75 verime sahip aşı kopolimer ise aynı şartlarda sırasıyla % 76, % 69 ve % 65 salım yapmıştır.

Alt kiritik çözünme sıcaklığına (LCST) sahip polimerik mikroküreler bu sıcaklığın altında H bağ etkileşimi ile şişerler [102]. Üstünde ise kendi grupları arası etkileşmeyi tercih eder ve büzüşürler. Dolayısı ile 25 °C da ilaç salımı hızlı iken, 37 °C da yavaşlamaktadır. Üç aşı yüzdesinde de benzer sonuçlar bulunmuştur.

Mikrokürelerin şişme derecelerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinde sıcaklığın artmasıyla şişmenin azaldığı gözlenmiştir. Şekil 3.42’de şişme sonuçları verilmiştir. Şekil 3.42 (A)’da % 14 verimli mikrokürenin 24 saat sonunda 25, 32 ve 37 °C de sırasıyla % 133, % 93 ve % 78 oranında şişmekte olduğu görülmektedir. Şekil 3.42 (B)’de % 56 verimli mikrokürenin 24 saat sonunda 25 °C de % 103, 32°C de % 76 ve 37 °C de % 65 oranında şişmektedir. Şekil 3.42 (C)’de % 75 verimli mikrokürelerde şişme davranışı incelendiğinde 25, 32 ve 37 °C de sırasıyla % 95, % 67 ve % 48 oranında şişme derecesine sahip olduğu belirlenmiştir [106].



Şekil 3.41. % 14 aşı yüzdeli (A), % 56 aşı yüzdeli (B) ve % 75 aşı yüzdeli (C) mikrokürelerde 5-FU salımına sıcaklık etkisi



Şekil 3.42. %14 aşı yüzdeli (A), % 56 aşı yüzdeli (B) ve % 75 aşı yüzdeli (C) mikrokürenin şişme derecesi

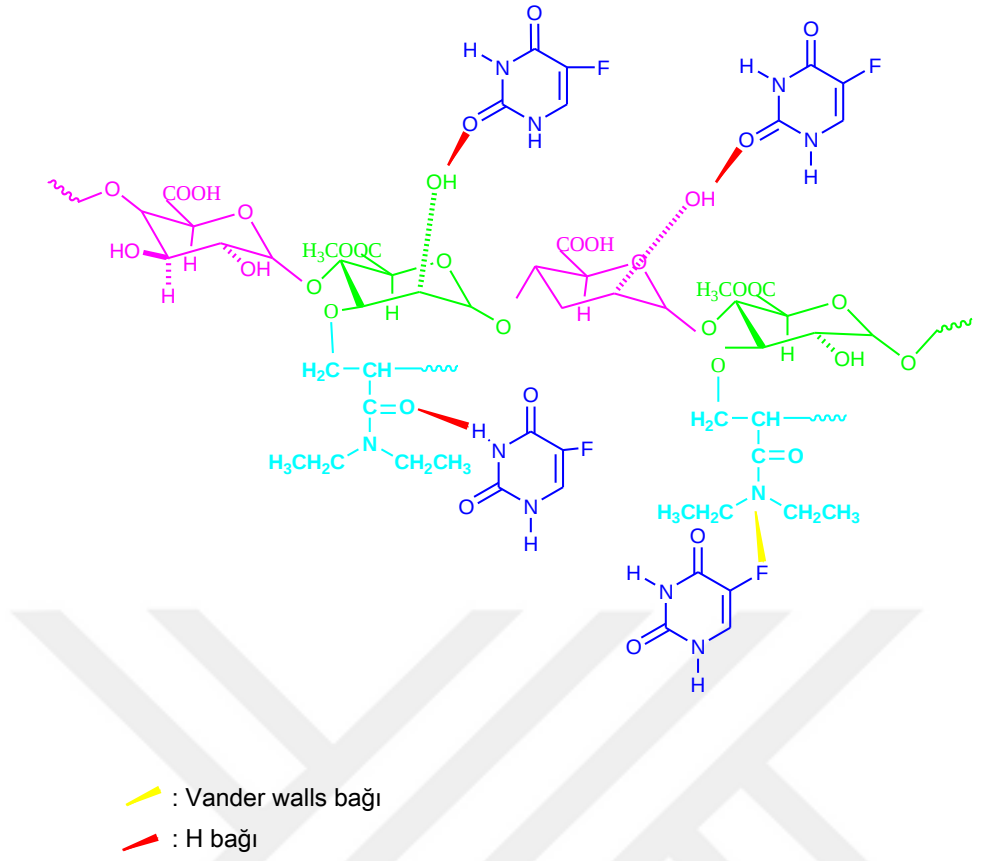
3.5.3. İlaç/Polimer Oranının 5-Fluorourasil Salımına Etkisi

Mikrokürelerden 5-FU salımına i/p oranının etkisini incelemek için i/p oranları 1/4, 1/2, 1/1 ve 2/1 olarak değiştirilerek mikroküreler elde edilmiştir. Şekil 3.44’de ilaç/polimer oranının 2/1’den 1/4’e azalmasıyla mikrokürelerden % ilaç salımının 24 saat sonunda % 99’dan % 33’e azaldığı görülmektedir. Çizelge 3.8’de tüm formülasyonların 24 saat sonundaki 5-FU salım değerleri belirtilmiştir. İlaç derişiminin artması ile salım hızının artmasının sebebi, kopolimer çözeltisindeki ilaç kristallerinin çapraz bağlanmayı engellediği ve salım hızını arttırdığı düşünülmektedir. Çalışılan formülasyonlardan 1/1 ilaç/polimer içeren mikroküre yüksek tutuklanma veriminden ve uygun salım şartlarından dolayı bir sonraki parametreler için seçilmiştir. Ayrıca Şekil 3.43’de ilaç polimer etkileşimi verilmiştir.

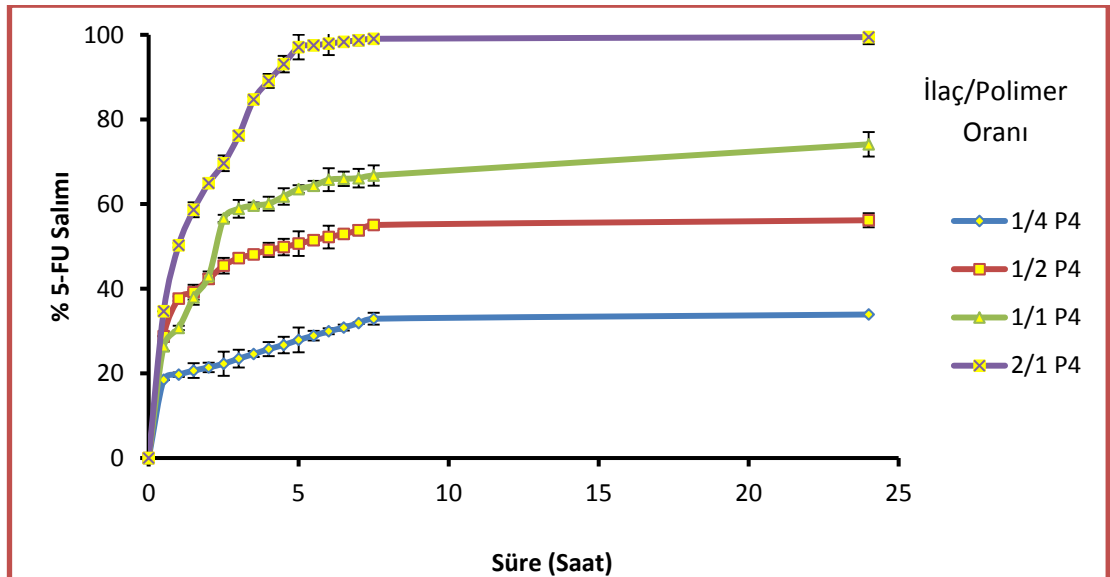
Benzer sonuçlar literatürde de bulunmaktadır [107, 108]. Denkbaşı ve arkadaşlarının çalışmasında 5-FU yüklü kitosan mikrokürelerinde ilaç miktarı 2,5 mg/mL den 10 mg/mL’ ye artırıldığında % salım değerlerinin arttığı bildirilmiştir [107].

Çizelge 3.8. İ/P oranlarının 24 saat sonunda salım oranları

İlaç/Polimer (m/m)	Formülasyon	24 saat sonunda salım (%)	Ortam Sıcaklığı (°C)
1/4	P ₄	33	37
1/2	P ₄	56	37
1/1	P ₄	74	37
2/1	P ₄	99	37



Şekil 3.43. 5-FU'nun aşı kopolimer ile etkileşimi

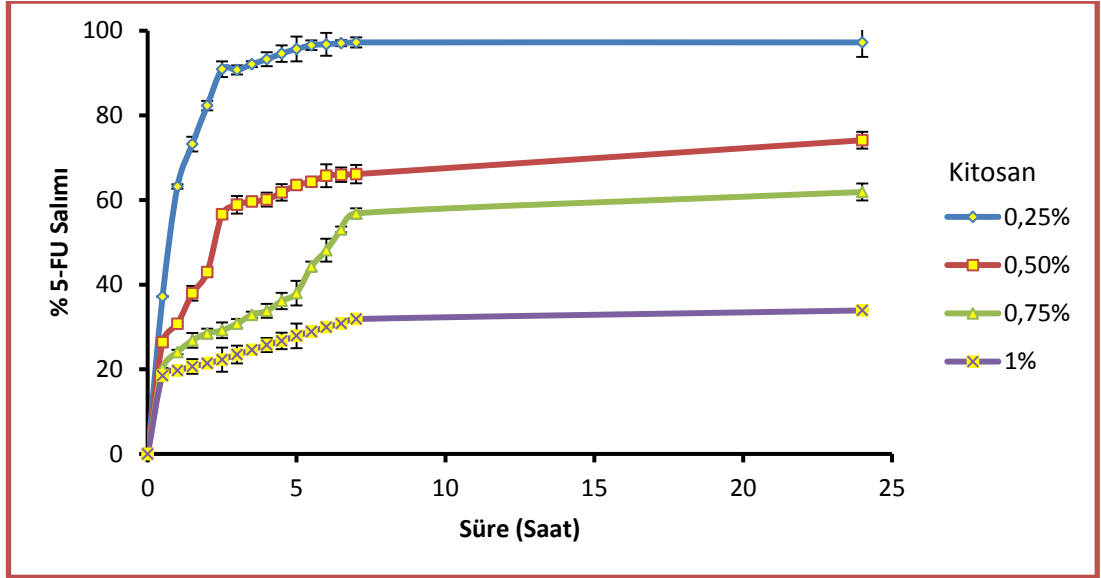


Şekil 3.44. İlaç/polimer oranının 5-FU salıma etkisi

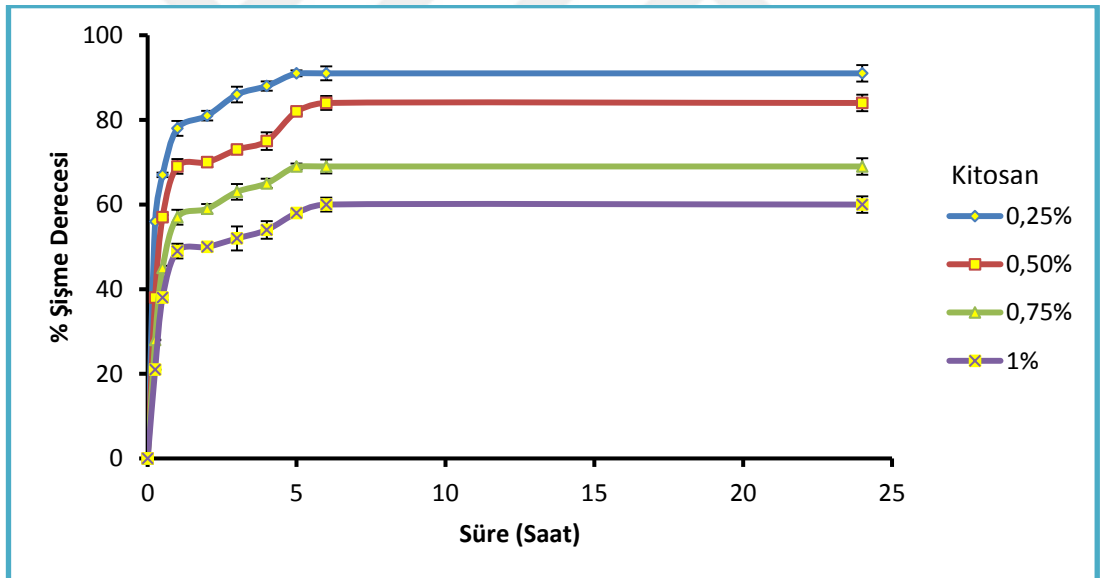
3.5.4. Kitosan Yüzdesinin 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi

Mikrokürelerden 5-FU salımına kitosan yüzdesinin etkisini incelemek için seçilen % 56 yüzdeli (P4) aşırı kopolimerden, 0,1 M NaOH, 0,5 M ZnCl₂, 37 °C ve 1/1(i/p) oranında sadece kitosan yüzdesi değiştirilerek mikroküreler hazırlanmış ve 5-FU salım davranışı incelenmiştir. Kitosan yüzdesi % 0,25-1 aralığında değiştirilmiş ve sonuçlar Şekil 3.45’de sunulmuştur. Kitosan yüzdesinin artması ile 5-FU salımı önemli ölçüde azalmaktadır. Kitosan yüzdesinin 0,25 den 1 e artırılmasıyla 24 saat sonunda 5-FU salımı % 97 den % 33 e kadar azalmıştır. Kitosan yüzdesinin artmasıyla mikroküre yüzeyine kaplanan kitosan miktarının arttığı ve bu tabakanın 5-FU geçişini zorlaştırdığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar literatürlerde de tespit edilmiştir. Örneğin Ramesh ve arkadaşlarının çalışmasında ilaç yüklü kitosan kaplı sodyum aljinat nanokürelerden 5-FU geçişini incelemişler ve benzer sonuçlar rapor etmişlerdir [109, 110, 111].

Mikrokürelerin şişme davranışları 5-FU salım sonuçlarını desteklemiş ve Şekil 3.46’da sunulmuştur. Şekil incelendiğinde çapraz bağlanma çözeltisindeki kitosan miktarı arttıkça % şişme değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Hazırlanan mikroküreler 6 saatte denge şişme derecelerine ulaşmışlardır. Kitosan yüzdesinin artmasıyla şişme derecesinin azalmasının, polimerik matriksteki bağlanan kitosan birimlerinin yoğunluğunun artmasına, bundan dolayı mikroküre içerisine nüfus eden su moleküllerinin azalmasına atfedilebilir. Benzer sonuçlar literatürde de rapor edilmiştir [112].



Şekil 3.45. Kitosan yüzdesinin 5-FU salıma etkisi

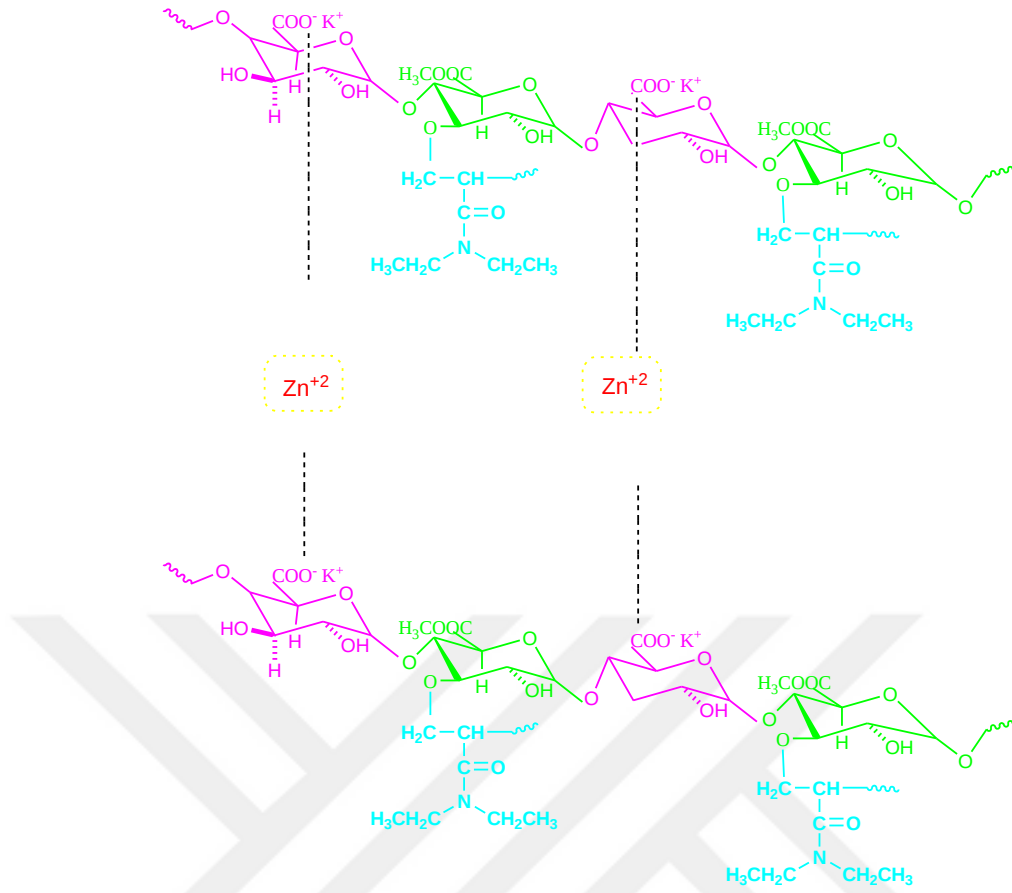


Şekil 3.46. Kitosan yüzdesinin şişme derecesine etkisi

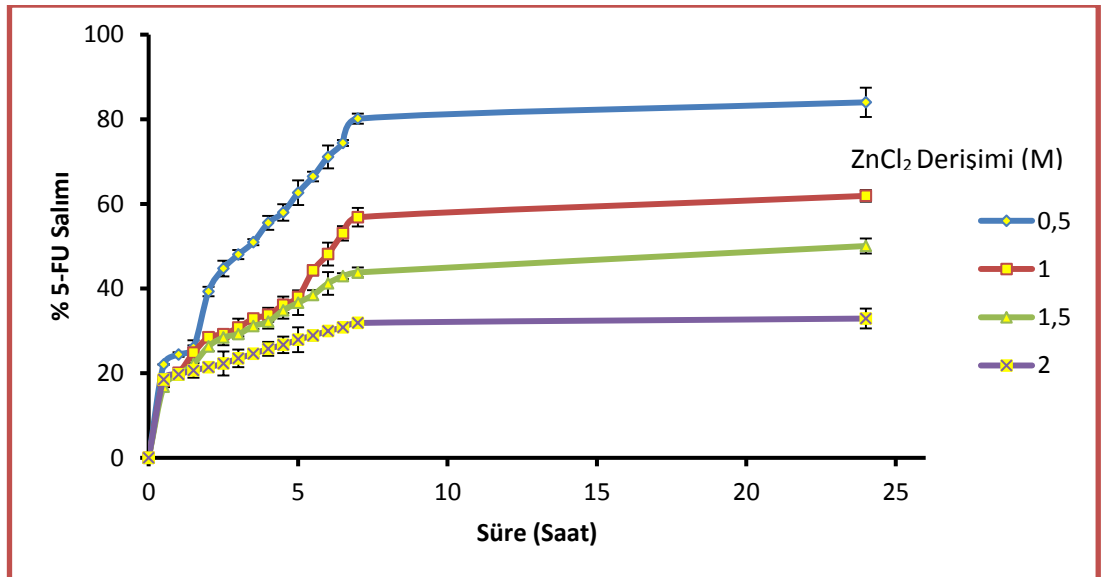
3.5.6. ZnCl₂ Derişiminin 5-FU Salıma ve Şişme Derecesine Etkisi

Çapraz bağlanma derecesi mikrokürelerden ilaç salımında önemli bir parametredir. Bu da çapraz bağlayıcı derişiminin ya da bağlanma süresinin değiştirilmesi ile farklılaştırılabilir. Mikrokürelerden 5-FU salımına ZnCl₂ derişiminin etkisini incelemek üzere mikroküreler diğer parametreler sabit tutularak ZnCl₂ derişiminin 0,5-2 M aralığında değiştirilmesiyle hazırlanmış ve 5-FU salım sonuçları Şekil 3.48’de verilmiştir. ZnCl₂ derişiminin 0,5 M’den 2 M’a artmasıyla, 5-FU salımının 24 saat sonunda aşî kopolimerlerden elde edilen mikrokürelerinde % 84’ten % 32’ye azaldığı görölmektedir. Egg box modeline göre aşî kopolimerin –COO⁻ birimleri ile bağlanan Zn⁺² sayısı azaldıkça çapraz bağlanma derecesinin azaldığı düşünölmektedir (Şekil 3.47). Çapraz bağlama derecesinin azalması sonucunda, mikrokürelerin yapısında bulunan polimer zincirlerinin hareketliliği artmış ve difüzyon için kullanılan gözenekler genişlemiştir. Benzer sonuçlar literatürlerde rapor edilmiştir [113, 114]. Peng ve arkadaşlarının çalışmasında 5-FU içeren jelatin mikrokürelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu çalışmasında çapraz bağlanma miktarının 0,1 mL/g dan 0,5 mL/g’a artışında ilk yarım saat sonunda salım miktarı %34 den %10’a azaldığı ve ilk 1 saat sonunda % 70 den % 41’e azaldığını bildirilmiştir [115].

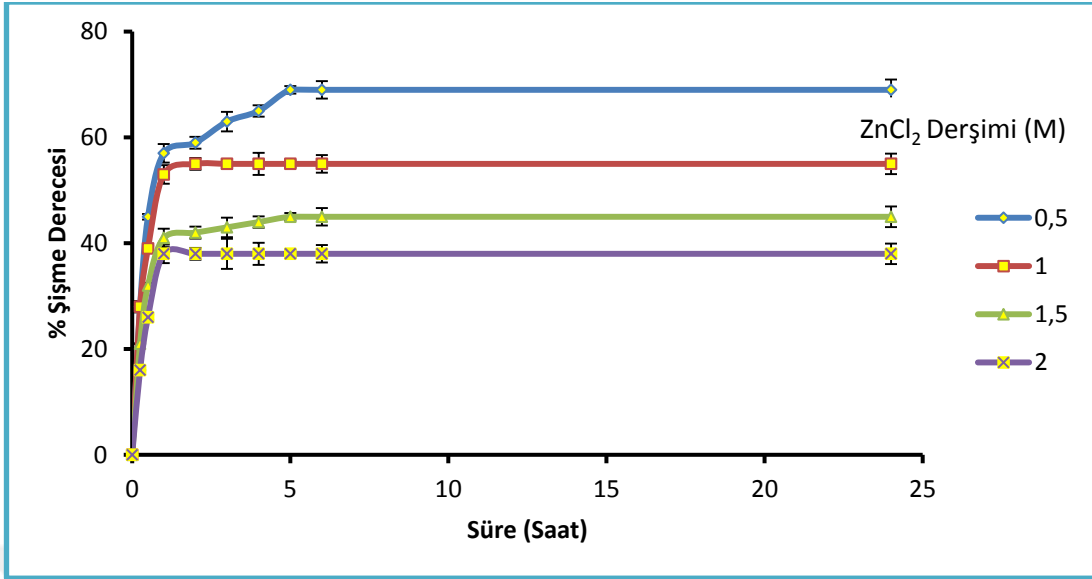
Şekil 3.49’da çapraz bağlayıcı derişimi artırılmasıyla şişme derecelerinin azaldığı gözlenmiştir. Çapraz bağlayıcı miktarının artmasıyla mikrokürelerdeki amorf bölgelerde serbest hacimler azalmış, bu da su moleküllerinin daha zor difüzyonunu sağlayarak mikrokürelerin şişme derecesini düşürmüştür. Ranjha ve arkadaşlarının pH duyarlı pektin/akrilik asit hidyojellerinden verapamil salım çalışmasında çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça şişme ve salımın azaldığı rapor edilmiştir [116].



Şekil 3.47. Pek-aşı-PDEAAm ile ZnCl₂ çapraz bağlanma mekanizması



Şekil 3.48. ZnCl₂ derişiminin 5-FU salımına etkisi



Şekil 3.49. ZnCl₂ derişiminin şişme derecesine etkisi

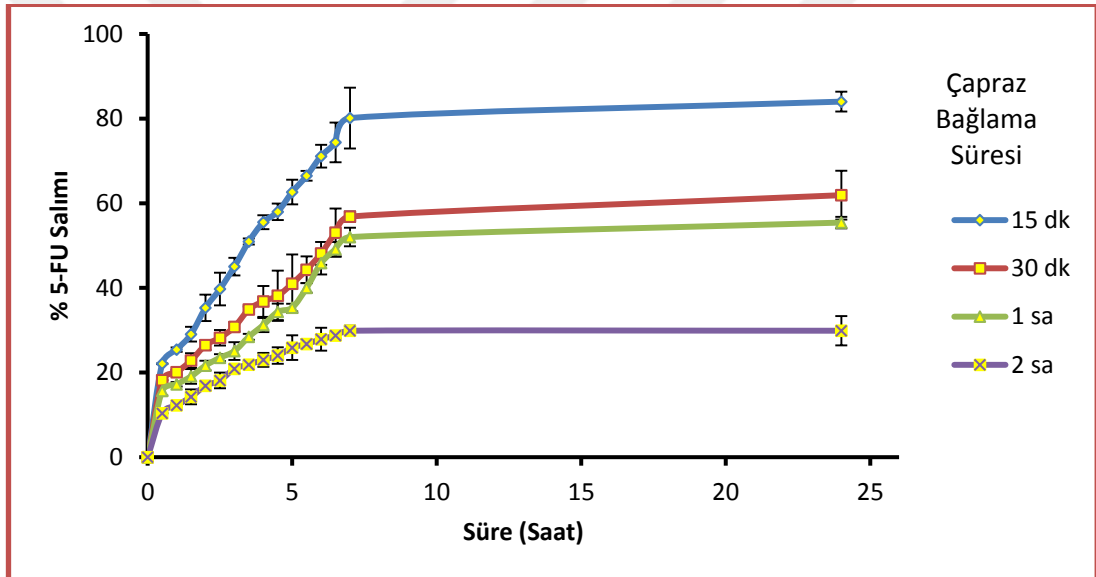
3.5.7. Çapraz Bağlama Süresinin 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi

Mikrokürelerden 5-FU salımına çapraz bağlama süresinin etkisini incelemek için diğer parametreler sabit tutularak (% 5 kopolimer, 0,1 N NaOH, % 0,75 kitosan, 37 °C, 1/1(i/p), 1M ZnCl₂ alınmış ve çapraz bağlama süreleri 15 dakika, 1 saat, 1,5 saat, 2 saat olarak değiştirilmiştir. Çapraz bağlanma süresi 15 dakikadan 2 saate artırılmasıyla 24 saat sonundaki salım miktarı % 80'den % 20'ye azaldığı Şekil 3.50'de görülmektedir.

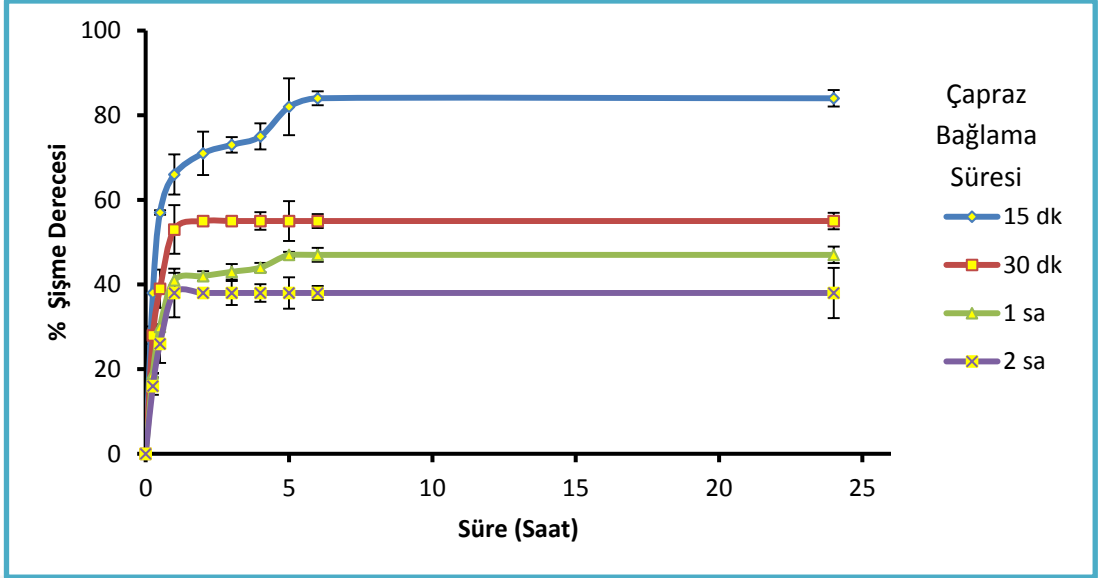
Çapraz bağlama süresinin artmasıyla mikrokürelerdeki çapraz bağlanma derecesinin arttığı, bunun sonucu 5-FU salımının azaldığı düşünülmektedir. Yuan ve arkadaşlarının çalışmasında genipin ile çapraz bağlanan kitosan mikrokürelerinden protein salımını incelemişlerdir [117]. Çalışma sonucunda çapraz bağlama süresi arttıkça kitosan mikrokürelerden protein salımının azaldığını gözlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Peng ve arkadaşları 5-FU içeren jelatin mikrokürelerinin hazırlanmış ve çapraz bağlanma süresi 1 saatten 3 saate artırılması ile ilaç salımının ilk bir saat sonunda % 70'den % 47'ye düştüğünü rapor etmişlerdir [115].

Çapraz bağlama süresinin şişme dengesine etkisi Şekil 3.51’de incelenmiştir. Şekil incelendiğinde Şekil 3.50’ye benzer şekilde çapraz bağlanma süresi arttıkça mikrokürenin şişme dereceleri azalmıştır. Çapraz bağlanma süresi arttıkça Zn^{+2} ile bağlanan polimer birim sayısı artmakta ve daha sıkı bir mikroküre yapısı oluşmaktadır. Bundan dolayı da şişme dereceleri düşmüştür. Benzer eğilimler literatürde rapor edilmiştir [110].

Sonuç olarak ortam koşullarının değiştirilmesi ile istenilen salım özelliğinde mikrokürelerin sentezlenebileceği görülmektedir. Çapraz bağlanma süresinin 2 saate çıkarılması ile ilaç salımı yaklaşık % 30’a düşürülmüştür. Bununla birlikte daha önceki bölümlerde de en yüksek 5-FU salımı 2/1 i/p oranında % 99 olarak bulunmuştu.



Şekil 3.50. Çapraz bağlama süresinin ilaç salımına etkisi

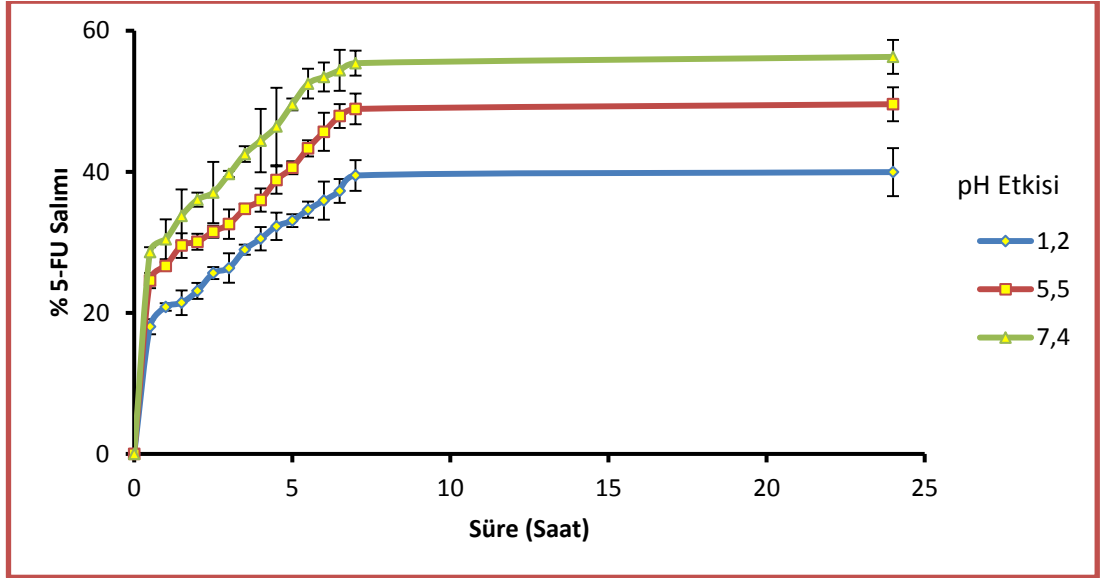


Şekil 3.51. Çapraz bağlama süresinin mikrokürelerin şişme derecesine etkisi

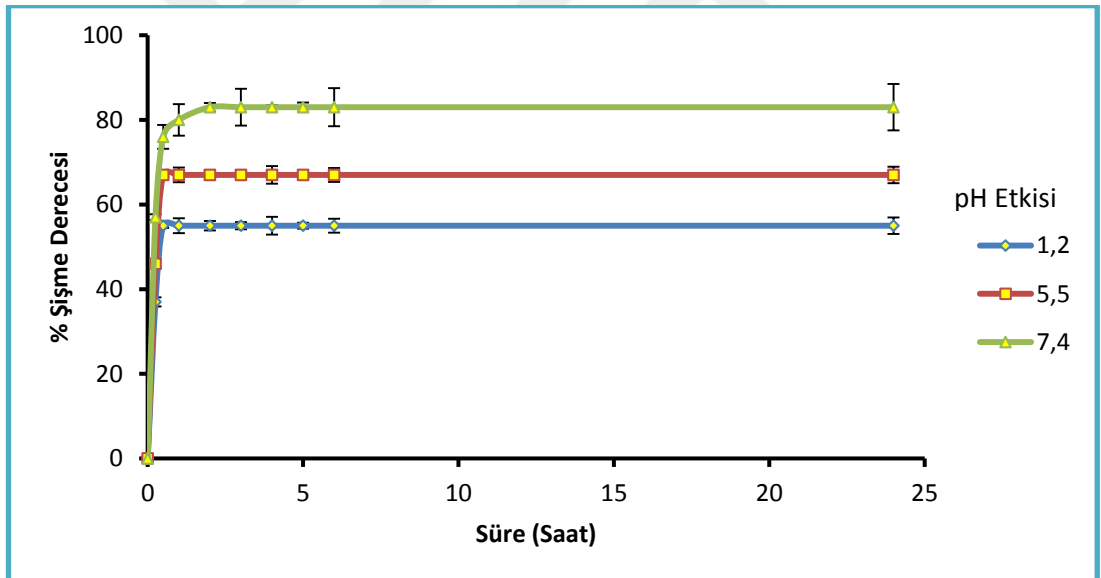
3.5.8. pH Değişiminin 5-FU Salımına ve Şişme Derecesine Etkisi

pH değişiminin 5-FU salımına etkisini incelemek için % 56 verimli (P₄) formülasyonuna sahip mikroküreler 1,2, 5,5 ve 7,4 tamponlarında 37 °C'de salımları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.52 ve 3.53'de verilmiştir. % 56 verimli mikrokürenin pH=1,2'de salınan ilaç miktarı % 40, pH=5,5'de % 50 ve son olarak pH=7,4'de % 56 salım gösterdiği bulunmuştur. Asidik ortamda pektin yapısının potasyum tuzu şeklinde olan –COO gruplarının –COOH gruplarına dönüşmesinden dolayı daha az salım yaptığı düşünülmüştür. pH=7,4 fosfat tamponunda aşırı mikrokürelerin karboksilik asit gruplarının –COO⁻ şeklinde iyonlaştığı ve negatif yüklü iyonların birbirlerini itmesinden dolayı mikroküre şişmelerinin yükseldiği ve bundan dolayı da 5-FU difüzyonunun arttığı düşünülmüştür. Ayrıca pH değeri azaltıldığında ise –COOH ve –OH grupları arasındaki H bağlarından dolayı daha sıkı yapıya sahiptir ve şişmeleri daha düşüktür.

Şekil 3.53'de ortam pH değişiminin şişme derecesine etkisi görülmektedir. Şekilden yaklaşık 1 saatte mikrokürelerin denge şişmelerine ulaştığı ve pH'nın artması ile şişme derecelerinin arttığı açıkça görülmektedir. Benzer sonuçlar literatürde de bulunmaktadır [118].



Şekil 3.52. Salım ortamı pH'sının 5-FU salımına etkisi



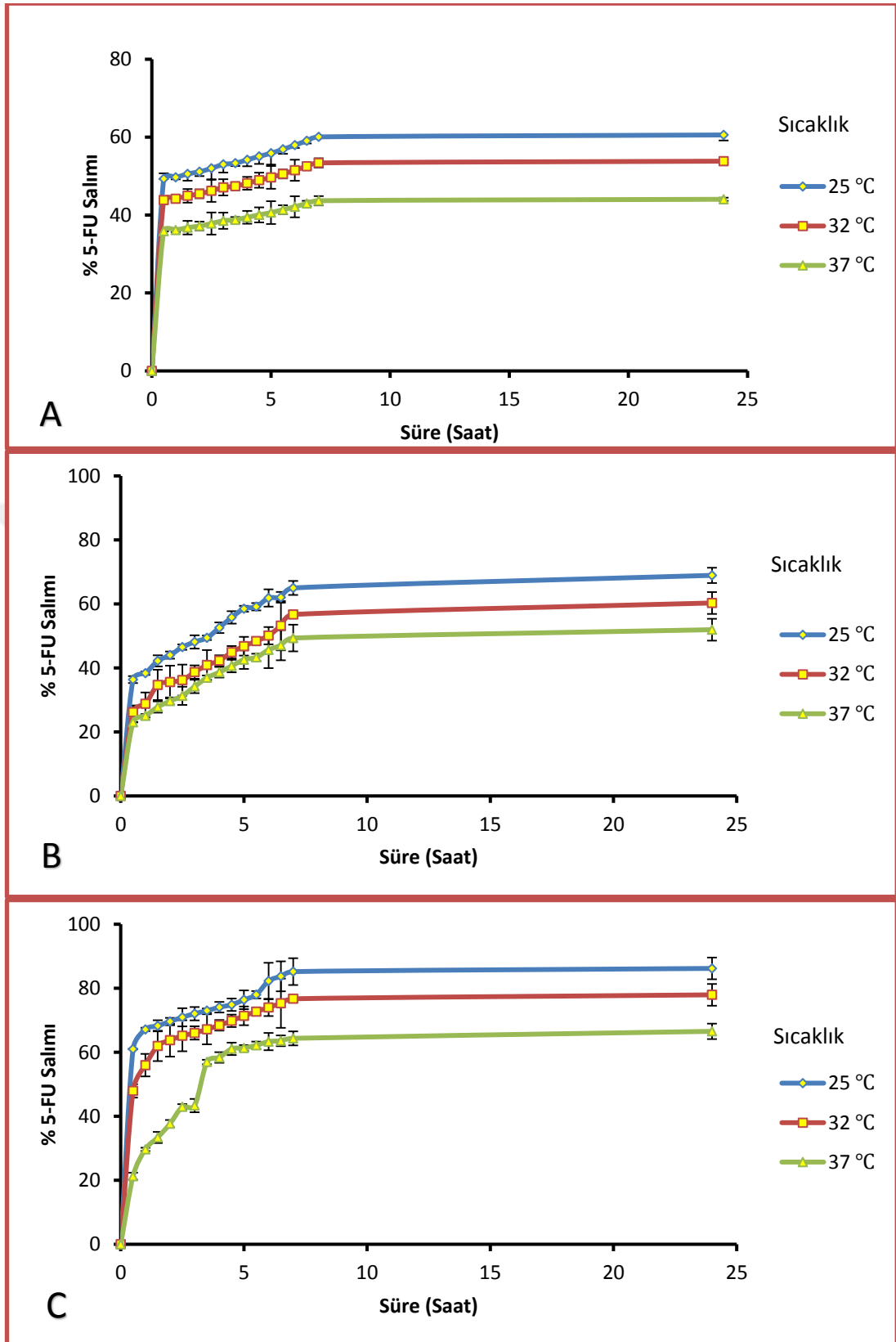
Şekil 3.53. Salım ortamı pH'sının şişme derecesine etkisi

3.6. Aynı Tampon ve Farklı Sıcaklıklarda Tüm Gün Boyuca Salım ve Şişme Etkisi

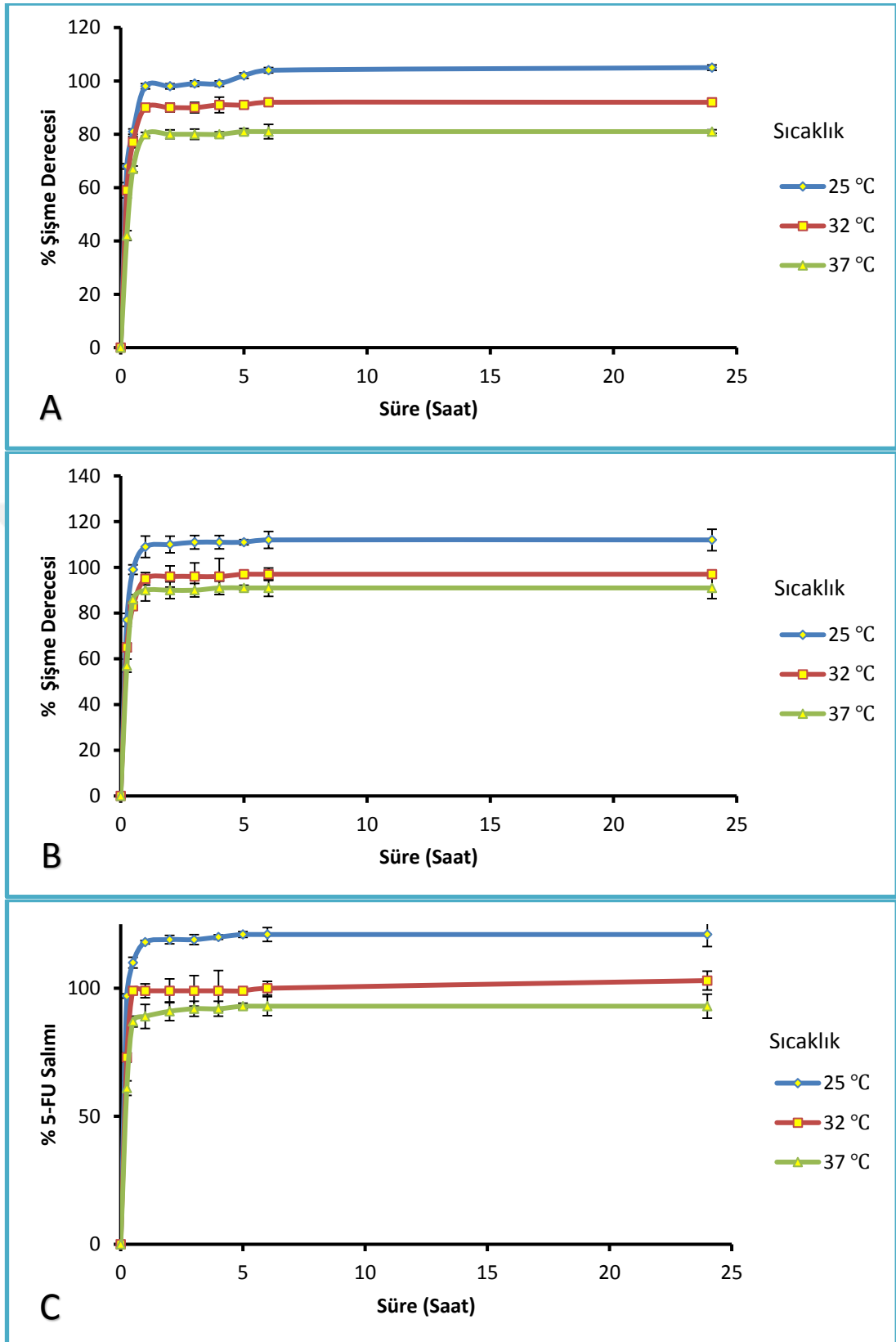
Sıcaklığın ve pH'nın etkisini daha iyi anlayabilmek için ayrıca 3 farklı aşı kopolimer 3 farklı sıcaklıklarda gün boyunca ayrı ayrı 3 farklı pH ortamında çalışılmıştır.

3.6.1. Pek-aşı-PDEAAm (P₁) Mikrokürelerinde Sıcaklığın 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi

Pek-aşı-PDEAAm (% 14) mikrokürelerden pH=1,2; 5,5; 7,4 tamponlarında 24 saat boyunca farklı sıcaklıkta (25, 32, 37 °C) salım davranışları incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.54'de verilmiştir. pH=1,2 tamponunda 24 saat sonunda 5-FU salımı 25 °C için % 60 iken 32 ve 37 °C de sırasıyla % 53 ve % 44'e düştüğü belirlenmiştir. pH=5,5 tamponunda 24 saat sonunda 25 °C de % 68 iken 32 ve 37 °C de sırasıyla % 60 ve % 51 oranında 5-FU salımı gözlenmiştir. pH=7,4 tamponunda ise 5-FU salımı 25 °C de % 86 iken 32 ve 37 °C de sırasıyla % 77 ve % 66 oranında değişmektedir. Düşük aşı yüzdeli olmasına rağmen mikroküreler sıcaklığa duyarlılık göstermiş ve 25 °C da hızlı salım 37 °C da yavaş salım göstermiştir.



Şekil 3.54. % 14 aşılı yüzdeli mikrokürelerin pH=1,2 (A), pH=5,5 (B), pH=7,4 (C) 5-FU salımları



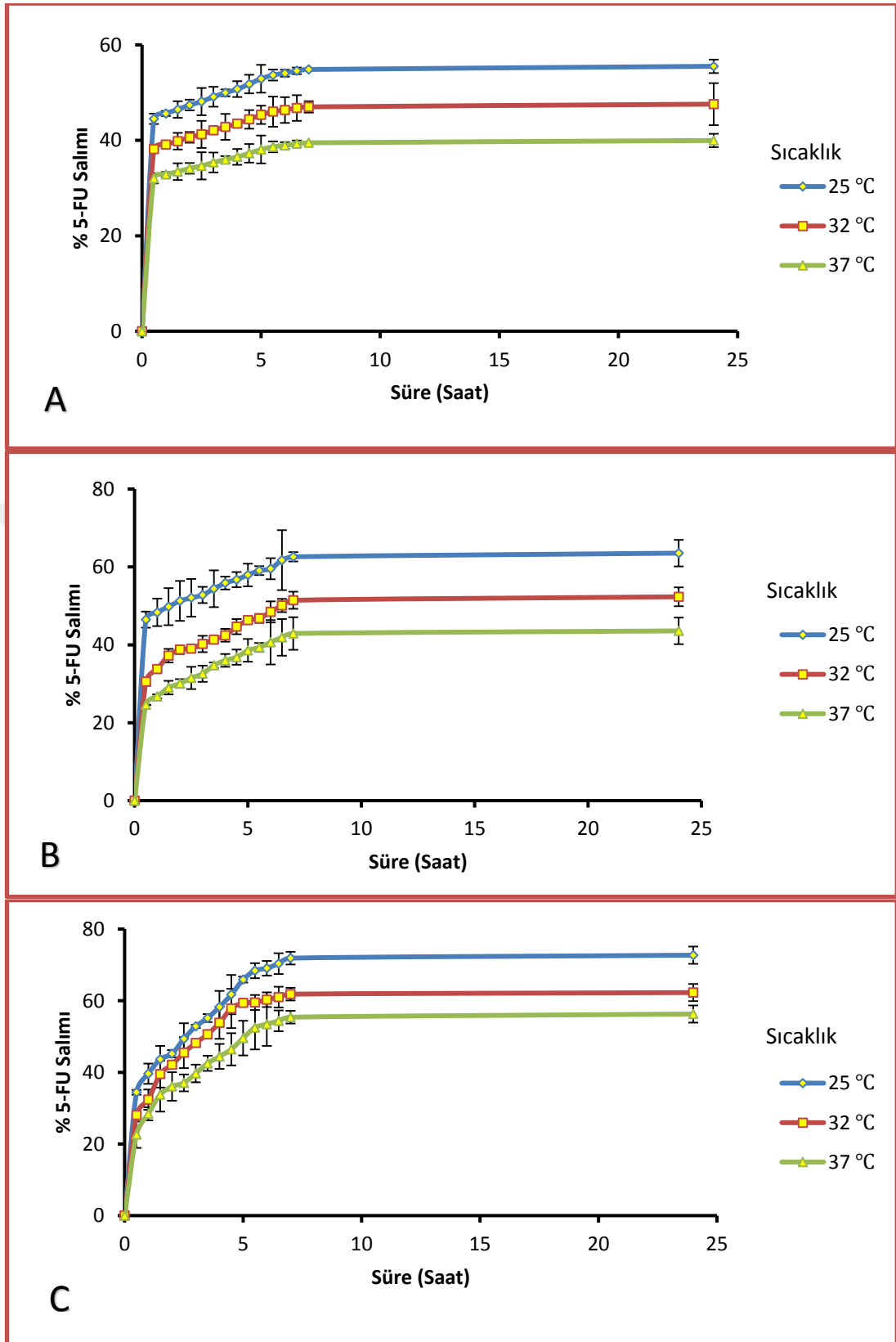
Şekil 3.55. % 14 aşı yüzdeli mikrokürelerin pH=1,2 (A), 5,5 (B), 7,4 (C) şişme derecesine sıcaklık etkisi

Gün boyu farklı tamponda şişme deneyleri de yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.55 (A, B, C)'de verilmiştir. Denge şişmelerine yaklaşık 1 saatte ulaşılmış ve sıcaklığın artması ile şişmeler azalmıştır. Denge şişme derecelerinin pH' ya bağlı olduğu bulunmuştur. Çalışılan pH larda en yüksek şişme değerine 7.4'de ulaşılmıştır ve pH değeri azaldıkça şişme derecesi de azalmıştır. Bunun mikrokürelerin yapısında bulunan pektin ve kitosanın fonksiyonel gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Düşük pH'larda pektin üzerindeki –OH grupları arasındaki H bağlarından ve –COOH gruplarından dolayı mikroküreler daha sıkı yapıya sahiptirler ve şişmeleri düşüktür.

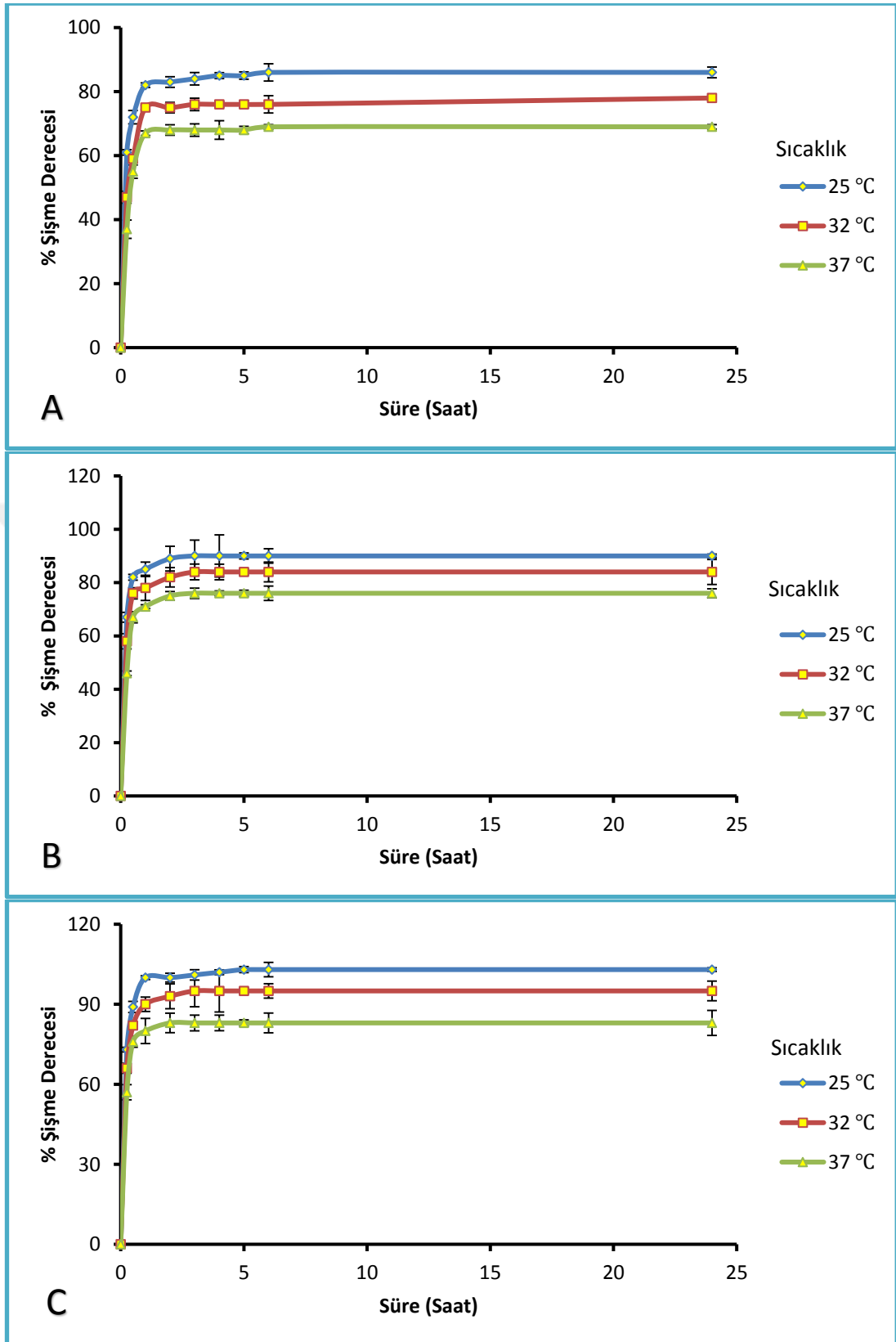
3.6.2. % 56 Aşı Yüzdeli (P₄) Mikrokürelerinde Sıcaklığın 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi

Orta aşı yüzdeli mikrokürelerde 1 gün boyunca pH=1.2; 5.5; 7.4 tamponlarında ve farklı sıcaklıklarda 5-FU salımı incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.56 (A, B, C)'da sunulmuştur. Benzer şekilde sıcaklığın artması ile orta aşı yüzdeli mikrokürelerde de 5-FU salımı azalmıştır. Ayrıca % 14 aşı verimli mikrokürelere göre 5-FU salımının azaldığı görülmektedir.

Şişme deneyleri aynı ortamlarda gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.57 (A, B, C)'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar salım davranışlarını desteklemektedir. Şekilden her üç pH ortamında da 37 °C'de daha az mikroküre şişmesinin olduğu görülmektedir.



Şekil 3.56. % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (A), 5,5 (B), 7,4 (C) 5-FU salımına sıcaklık etkisi

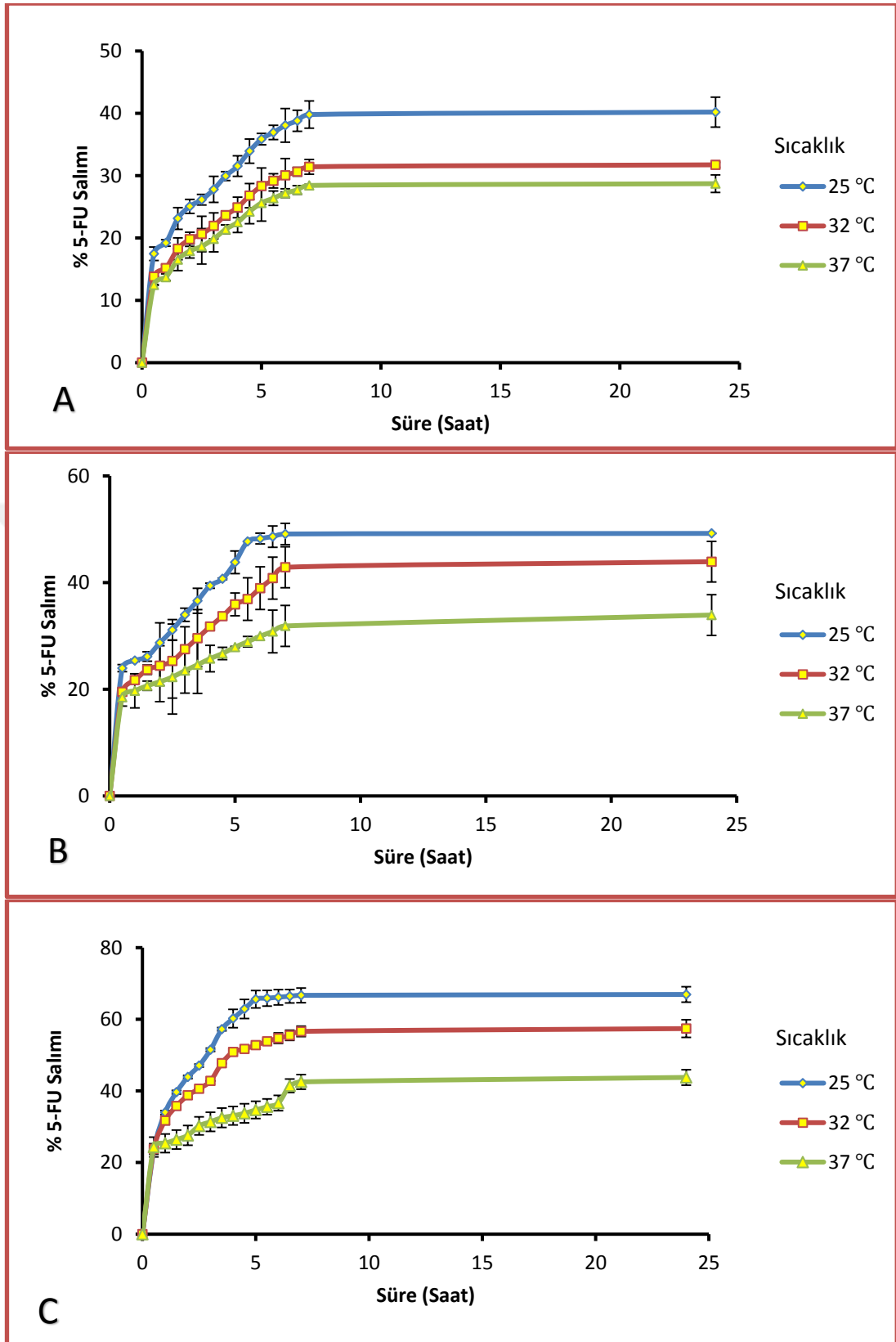


Şekil 3.57. % 56 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (a), 5,5 (b), 7,4 (c)'de şişme derecesine sıcaklık etkisi

3.6.3. % 75 Aşı Yüzdeli (P₅) Mikrokürelerde Sıcaklığın 5-FU Salımı ve Şişme Derecesine Etkisi

Yüksek aşı yüzdeli (75) mikrokürelerde 1 gün boyunca pH=1,2; 5,5; 7,4 tamponlarında ve farklı sıcaklıklarda 5-FU salımı incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.58 (A, B, C)'de sunulmuştur.

Şekil 3.58 incelendiğinde pH=1,2 tamponunda 25 °C 32 °C ve 37 °C sıcaklıklarda sırasıyla 5-FU salımı % 40, % 32 ve % 29 olarak bulunmuştur. pH=5,5 tamponunda 25 °C, 32 °C ve 37 °C sıcaklıklarda sırasıyla 5-FU salımı % 49, % 44 ve % 34 olarak artmıştır. pH=7,4'de ise ilaç salımı sırasıyla % 67, % 57, % 44 olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere genel olarak 25 °C da 5-FU salımı yüksek çıkmış ve pH'nın artması ile ilaç salımı da artmıştır. Bununla birlikte aşı mikrokürelerin yüzeyleri kitosan ile kaplandığı için düşük pH'da da ilaç salımı çok düşük değildir. Ayrıca bu bölümdeki 5-FU salım grafiklerinden aşı yüzdesi ile ilaç salımının azaldığı açıkça görülebilmektedir. Sonuç olarak aşı yüzdesinin değiştirilmesi ve ortam koşullarına bağlı olarak (pH ve sıcaklık) değişik salım profilleri elde etmek mümkündür.

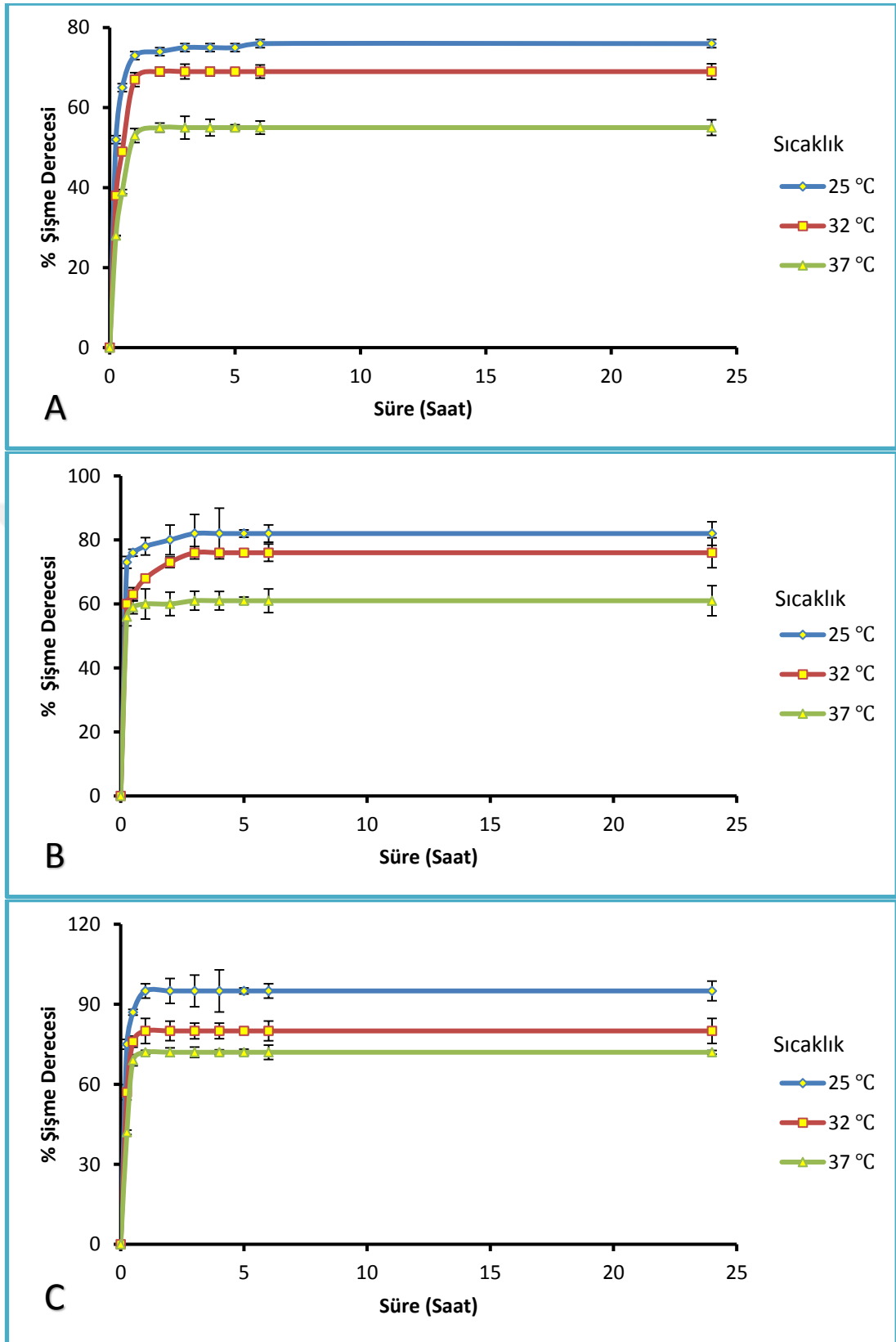


Şekil 3.58. % 75 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (A), 5,5 (B), 7,4 (C)'de 5-FU salımına sıcaklık etkisi

Yüksek aşı yüzdesine sahip mikrokürelerin şişme derecelerinin sıcaklıkla değişimleri Şekil 3.59’da sunulmuştur. Bu formulasyonda da sıcaklıkla birlikte şişme derecelerinin daha belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir.

Bu bölümde 3 farklı aşı verimindeki mikrokürelerde elde edilen sıcaklık etkisi önceki bölümdeki ile uyumlu bulunmuştur. Tüm aşı mikroküreleri yüksek sıcaklıklarda (37 °C) hidrofob etkileşimlerinden dolayı daha az şişmiş ve daha yavaş 5-FU difüzyonu gerçekleşmiştir. Düşük sıcaklıkta ise su-polimer hidrofilik etkileşimleri baskın gelmiş ve mikroküreler daha fazla şişerek, daha hızlı 5-FU difüzyonu gerçekleşmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre mikrokürelerden hem 5-FU salımını hem de şişme derecelerini, aşı yüzdesi, sıcaklık ve pH önemli derecede etkilemektedir. Bu değişimler ile farklı salım profilleri elde edilebilmektedir.



Şekil 3.59. % 75 aşı yüzdeli mikrokürelerde pH=1,2 (a), 5,5 (b), 7,4 (c)'de şişme derecesine sıcaklık etkisi

3.7. Kinetik Sonuçlar

Değişik formülasyonlarda hazırlanmış mikrokürelerin salım sonuçlarının kinetik değerlendirmesi ile elde edilen salım mekanizmasını belirleyen difüzyonel sabit n , salım hız sabiti k ve korelasyon sabiti r değerleri Çizelge 3.9'da verilmiştir. Bu değerler Bölüm 1.10'da verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır. İlaç salımı gerçekleşmeden önce etken madde polimer içerisinde dağıtılmış ya da çözünmüş olarak bulunmaktadır. İlaç katı polimerden dışarı difüzlenemez. Ancak çözücü molekülleri polimerik matrikse girince polimer şişer ve şişen polimer ilacın difüzyonuna izin verir. Böylece polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde oluşan ilaç salımı gerçekleşir. Genel olarak, sistemlerin şişme davranışları Fick tipi (difüzyon kontrollü) ve Fick olmayan (şişme ve difüzyon kontrollü) olarak sınıflandırılır [53, 54].

$n=0,43$ olduğunda Fick yasasına uygun ilaç geçişini, $n=0,85$ olduğunda Durum II (şişme kontrollü) ilaç geçişini göstermektedir. $0,43 < n < 0,85$ ise Fick yasasına uymayan ya da anormal ilaç geçişini gösterir. Fick difüzyonu olduğunda salım ilaç difüzyonuyla gerçekleşir. Fick olmayan ya da anormal geçişte ise difüzyon ile polimer zincirlerinin gevşeme hızları birbirlerine yakın durumda olmaktadır. İlaç salımı iki eş zamanlı difüzyona bağlıdır. İlki çözücünün mikroküreye difüzyonu, ikincisi ilacın difüzyonudur. Durum II difüzyonu (gevşeme kontrollü taşıma) olduğunda relaksasyon prosesiyle hızlı difüzyon gerçekleşir. Polimer relaksasyonu tarafından suyun geçişi kontrol edilir ve ilaç salımı şişme kontrollü olarak gerçekleşir [54]. Sonuçlar incelendiğinde 5-Fluorourasil salımının hem pektin hem de Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerinde Fick yasasına uymadığı görülmektedir. Bunun salımın azalmasıyla ilacın mikrokürelerden difüzyonunun azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Mikrokürelerden ilaç salımı aynı zamanda difüzyon katsayısı (D) değerlerinin hesaplanması ile karakterize edildi.

D değerlerinin pektin mikroküresi için $6,35 \times 10^{-12}$ m/s, Pek-aşı-PDEAAm mikroküreleri için $5,22 \times 10^{-12}$ ile $0,17 \times 10^{-12}$ m/s aralığında değiştiği bulunmuştur. Kopolimerlerden elde edilen mikroküreler için çapraz bağlayıcı derişiminin, çapraz bağlanma süresinin, $ZnCl_2$ derişiminin ve kitosan oranının artmasıyla ilaç salımının

azalmasına bağlı olarak D değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. i/p oranındaki artmadan kaynaklı D değerlerinin arttığı görülmüştür.

Çizelge 3.9. Farklı formülasyonlarla elde edilen Pektin ve Pek-aşı-PDEAAM mikrokürelerinden 5-FU salımının kinetik parametreleri ve difüzyon katsayısı değerleri

Simge	$D \times 10^{12}$ (m/s)	$k \times 10^5$	n	r	Difüzyon Mekanizması
P0	6,35	5,5	0,54	0,86	Fick'e Uygun
P1	5,22	14,2	0,39	0,92	Fick'e Uymayan
P2	3,94	22,2	0,37	0,99	Fick'e Uymayan
P3	2,38	23,6	0,36	0,99	Fick'e Uymayan
P4	1,27	43,8	0,30	0,99	Fick'e Uymayan
P5	0,17	46,7	0,27	0,99	Fick'e Uymayan
PD ₁	3,12	12,3	0,35	0,99	Fick'e Uymayan
PD ₂	10,21	15,7	0,43	0,96	Fick'e Uygun
PD ₃	20,13	17,1	0,56	0,94	Fick'e Uymayan
PC ₁	10,54	19,8	0,40	0,98	Fick'e Uymayan
PC ₂	9,14	17,2	0,35	0,99	Fick'e Uymayan
PC ₃	6,52	16,9	0,31	0,79	Fick'e Uymayan
PZ ₁	8,76	28,4	0,65	0,72	Fick'e Uymayan
PZ ₂	7,63	26,5	0,57	0,72	Fick'e Uymayan
PZ ₃	6,94	14,6	0,42	0,78	Fick'e Uygun
PM ₁	10,04	15,9	0,72	0,85	Fick'e Uymayan
PM ₂	8,65	14,6	0,70	0,85	Fick'e Uymayan
PM ₃	5,91	13,5	0,68	0,85	Fick'e Uymayan

4. SONUÇLAR

1. Pektine N,Ndiethylakrilamid monomeri aşılansmış ve elde edilen aşı kopolimerin yapısı FTIR, RAMAN, DSC, TGA, NMR ve GPC ile aydınlatılmıştır.
2. Mikrodalga sisteminde elde edilen aşı kopolimerin çalışma koşulları: t=4saat, T=35 °C, [CAN]=4,5x10⁻³ M, [TEMED]=1,98x10⁻³ M, [Pektin]=2 g/dL, [DEAAm]=0,548 M, MG=1200 Watt olarak bulunmuştur.
3. Optimum koşullarda aşı yüzdesi ve aşılama verimi sırasıyla % 191 ve % 165 olarak elde edilmiştir.
4. Pektin'e PDEAAm aşılansması sonucunda DSC termogramda T_g değerinin azaldığı gözlenmiştir.
5. SEM sonuçlarına göre pektine PDEAAm aşılansması ile pektin yapı modifikasyonları gerçekleşmiş ve daha pürüzlü yapı elde edilmiştir.
6. Pektin'e PDEAAm aşılansması ile pektine sıcaklığa duyarlılık kazandırılmıştır. Geçirgenlik ölçümlerinden pektinin LCST değerinin olmadığı, aşılama ile LCST değerinin 31 °C olduğu bulunmuştur.
7. Pek-aşı-PDEAAm aşıkopolimerinden hidfolik 5-FU yüklü mikroküreler elde edilmiş ve yapıları FTIR, DSC, SEM, AFM, XRD ve MTT gibi yöntemlerle aydınlatılmıştır.
8. Mikroküre içerisindeki 5-FU varlığı FTIR ve XRD ile doğrulanmıştır.
9. Mikrokürelerden ilaç salımının sıcaklık arttıkça azaldığı gözlenmiş ve elde edilen mikrokürelerin pH duyarlılığı olan sistemler olduğu bulunmuştur.
10. % 14 aşı yüzdeli Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerde 5-FU salımı 25 °C ve 37 °C çalışma sıcaklığında % 0,5 kitosan + 1 M ZnCl₂ derişimindeki çapraz bağlama çözeltisinde 30 dakika olgunlaştırılma süresine sahip mikrokürelerde sırasıyla % 99 ve % 81 olarak hesaplanmıştır.

11. % 75 aşı yüzdeli Pek-aşı-PDEAAm mikrokürelerde 5-FU ilaç salımı 25 °C ve 37 °C çalışma sıcaklığında % 0,5 Kitosan + 1 M ZnCl₂ derişimindeki çapraz bağlama çözeltisinde 30 dakika olgunlaştırılan mikrokürelerde sırasıyla % 76 ve % 65 olarak hesaplanmıştır.

12. Aşı yüzdesinin artmasıyla PDEAAm'nin özelliğini göstererek % şişme derecelerinin azaldığı bulunmuştur.

13. Kitosan yüzdesinin artmasıyla 5-FU salımının azaldığı gözlenmiştir.

14. Çapraz bağlama derişiminin ve çapraz bağlama süresinin artmasıyla 5-FU salımının azaldığı gözlenmiştir.

15. Aşı kopolimer mikrokürelerinde LCST değeri 31 °C olarak bulunmuştur.

16. Çalışmanın kinetik sonuçları incelendiğinde genellikle Fick yasasına uygun olmadığı görülmüştür.

İki aşamalı olarak yapılan tez çalışmasında elde edilen veriler ve bu konuda literatürde vurgulanan hususlar bir arada değerlendirildiğinde aşağıda maddeler halinde sıralanan hususları öneri olarak sunuyoruz.

- Asidik ortamda salımı düşürmek için pH duyarlı bir başka polimer ile kombine çalışmalarının yapılması.
- Farklı uyarıcılara duyarlı taşıyıcı kapsüller geliştirilmesi için çalışmalar yapılması.
- Geliştirilen, uyarıya duyarlı sistemlerin duyarlılığının artırılmasına yönelik çalışmalar yapılması.
- Fizyolojik ortamda ilaç çözünürlüğü düşük ilaçların kontrollü serbestleştirilmesinde hazırlanan mikrokürelerin kullanımının geliştirilmesi.
- Biyouyumlu polimerle ağızdan insülin alınmasını sağlayan akıllı taşıyıcı sistem geliştirilmesi.
- Kanseri hücrelerine hedeflendirebilmek amacıyla folik asit gibi hedefleyici ajan takılması.
- İlaç kimyası, modern yöntemlerle ilaç taşıma ve salım sistemleri, akıllı taşıyıcı sistemler, kanser tedavisinde yeni tekniklerin geliştirilmesi

konularında ar-ge çalışmaları yapılması, ulusal bazda strateji üretilmesi, ulusal araştırma merkezi kurulması ve bu konuda yetkili resmi makamların gündem oluşturması.



KAYNAKLAR

- [1] N.N Sözmen, Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuartz Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler ile Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Başkent Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [2] G. z, Sıcaklığa Duyarlı Poli(N-Nizopropililakrilamid) Kopolimerinin Sentezi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2005.
- [3] Ma, L., Liu, M., Shi, X., pH- and temperature-sensitive self assembly microcapsules/microparticles: Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and drug release properties. Jour. of Bio. Mat. Res. Part B: App. Bio., 100 (2): 305-313, 2012.
- [4] Junzhang, S., Rentong, Y., Lei, W., Sixun, Z., Xiuhong, L., Poly(Nvinylpyrrolidone)-grafted poly(N-isopropylacrylamide) copolymers: synthesis, characterization and rapid deswelling and beswelling behavior of hydrogels. Poly. Acc. Man. 30-38, 2011.
- [5] Gan, L-H., Cai, W., Tam, K.C., Studies of phase transition of aqueous solution of poly(N,N-diethylacrylamide-co-acrylic acid)by differential scanning calorimetryand spectrophotometry. Euro. Poly. Jour., 37, 1773-1778, 2001.
- [6] Raffi, R., Franklin, W., Heflich R.H. and Cerniglia, C.E., Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human intestinal tract. Appl Env. Mivro. 57, 962-968, 1991
- [7] Mcready, R.M. Determination of citrus pectic substances by optical rotation. Analytical Chemistry. 23, 975-977, 1951.
- [8] Azhar, F.F., Olad, A., A study on sustained release formulations for oral delivery of 5-fluorouracil based on alginate–chitosan/montmorillonite nanocomposite systems. Appl. Clay Sci. 101, 288–296, 2014.
- [9] Clin Oncol J., Efficacy of IV continuous in fusion of 5-FU compared with bolus administiation in advanced colorectal cancer. Meta-Analy. Gr. Cancer. 16, 301-308, 1998.

- [10] Arias, J.L., Ruiz, M.A., López-Viota, M., Delgado, A.V., Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumor drug delivery: a comparative study. *Colloid and Surfaces B*, 62, 64-70, 2008.
- [11] Babu V.R., Krishna Rao, K.S.V., Sairam, M., Kumar Naidu, B.V., Hosamani, K.M., Aminabhavi, T.M. pH Sensitive interpenetrating network microgels of sodium alginate-acrylic-acid for the controlled release of ibuprofen. *J. Appl. Polym. Sci.* 99 (5): 2671-2678, 2006.
- [12] Baysal, B., *Polimer Kimyası Cilt-1, Polimerizasyon reaksiyonları*. ODTÜ Basım İşbirliği, Ankara, 1983.
- [13] Hoffman, A.S. Intelligent polymers. In: K. Park, Editor, *Controlled Drug Delivery*. American Chemical Society, Washington, 1997.
- [14] A., Altınışık, Synthesis, Characterization and applications of pH and temperature sensitive hydrogels. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 2011.
- [15] Berndt, I., Pedersen, J. S. and Richtering W. Structure of multiresponsive "intelligent" core-shell microgels. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (26), 9372-9373, 2005.
- [16] Gandhi, A., Paul, A., Sen, S.O., Sen, K.K., Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. *Asi. J. Pharm. Sci.*, 10, 99-107, 2015.
- [17] Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. and Chikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 27–46, 2000.
- [18] Sopinath, K. S., Aminabhavi, T. M., Dave, A. M., Kumbar, S. G. and Rudzinski, W. E. Stimulus-responsive 'smart' hydrogel as novel drug delivery systems. *Drug Del. Ind. Pharm.* 28, 957–974, 2002.
- [19] Gan, D. J. and Lyon, L. A. Fluorescence nonradiative energy transfer analysis of crosslinker heterogeneity in core-shell hydrogel nanoparticles. *Anal. Chim. Acta.*, 496, 53–63, 2003.
- [20] Zrinyi, M., Intelligent Polymer Gels controlled by magnetic fields. *Colloid Polym. Sci.* 103, 557-570, 2000.

- [21] Gil, E. S. and Hudson, S. M. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progr. Polym. Sci.*, 29, 1173–1222, 2004.
- [22] Teong, B., Chai, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G. and Kim, S. W., New biodegradable polymers for injectable drug-delivery systems. *J. Contr. Rel.* 62, 109–114, 1999.
- [23] Rim, Y. J., Choi, S., Koh, U., Lee, M., Ko, K. S. and Kim, S. W. Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer. *Pharm. Res.*, 18, 548–550, 2001.
- [24] Miyazaki, S., Suisha, F., Kawaski, A., Shirakawa, M., Yamatoya, K. and Anwood, O. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. *J. Contr. Rel.* 56, 75–83, 1998.
- [25] Bridsted, H., Kopecek, J., “pH Sensitive Gels”, “Polyelectrolyte Gels”, ACS Symposium Series, 480, 1992.
- [26] Bromberg, I., Intelligent polyelectrolytes and gels in oral drug delivery. *Curr. Pharm. Bio.* 4, 39–49, 2003.
- [27] Bartil, T., Bounekhel, M., Cedric, C. and Jerome, R. Swelling behavior and release properties of pH-sensitive hydrogels based on methacrylic derivatives. *Acta Pharm.*, 57, 301–314, 2007.
- [28] Gupta, K. C. and Ravi Kumar M. N. V. Preparation, characterization and release profile of pH-sensitive chitosan beads. *Polym. Int.*, 49, 141–146, 2000.
- [29] Pillay, V. and Fassihi, R. In vitro release modulation from cross-linked pallets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pHresponsive drug release and associated kinetics. *J. Contr. Rel.* 59, 229–242, 1999.
- [30] M., Çetik Erkol, Farklı Çapraz Bağlayıcılarla Hazırlanmış Poliakrilamit Ve Poli(2-Hidroksietil Metakrilat) Hidrojellerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz MART Üniversitesi, Çanakkale, 2010.

- [31] Brun-Graeppi, A. K. A. S., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., Merten, O. W. Thermoresponsive surfaces for cell culture and enzyme-free cell detachment. *Prog. Polym. Sci.* 35, 1311-1324, 2010.
- [32] Timuçin H., Sıcaklık Duyarlı Mikrotasıyıcıların Sentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, 2011.
- [33] Lensen, M., Hansen, P. B., Murdan, S., Frokjaer, S. and Florence, A. T. Loading into electro-stimulated release of peptides and proteins from chondroitin 4-sulphate hydrogels. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15, 139–48, 2002.
- [34] Tanaka, T., Nishio, I., Sun, S. T. and Ueno-Nishio, S. Collapse of gels in an electric field. *Sci.* 218, 467–9, 1982.
- [35] Blakemore, R. P. and Frankel R. B. Magnetic navigation in bacteria. *Sci. Am.*, 245, 58–65, 1981.
- [36] Bahadur, D. and Jyotsnendu, G. Biomaterials and magnetism, *Sadhana*, 28, 639–56, 2003.
- [37] Chatterjee, J., Haik, Y. and Ching, J. C. Modification and characterization of polystyrene based magnetic microspheres and comparison with albumin based magnetic microspheres. *J. Magn. Magn. Mater.* 225, 21–29, 2011.
- [38] Shinkai, M., Yanase, M., Suzuki, M., Honda, H., Wakabayashi, T. Yoshida, J. and et al., Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J. Magn. Magn. Mater.*, 194, 176–184, 1999.
- [39] Peppas N. A. Difüzyon Kontrollü Sistemler. Kontrollü ilaç serbestleştiren Sistemler. Tekno Grafik Ada Ofset Matbaası, İstanbul, 1989.
- [40] Agnihotri, S.A., S. J., Sheetal, Aminabhavi, T.M. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 249-261, 2006.
- [41] B. Keskin, Maleikanhidrit Kopolimerinin Parasetamol ile Kimyasal Modifikasyonu ve Kontrollü Salımının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi. 18-21, 2009.

- [42] Kayser, O., A. Lemke & N. Hernandez-Trejo. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6, 3-5, 2005.
- [43] J. H. Kim, Pyung-Kyu Park, Chung-Hak Lee, Heock-Hoi Kwon. Surface modification of nanofiltration membranes to improve the removal of organic micro-pollutants (EDCs and PhACs) in drinking water treatment: Graft polymerization and cross-linking followed by functional group substitution. *Jour. Memb. Sci.* 321 (2): 194-197, 2008.
- [44] B.Jeang, S.W.Kim, and Y.H.Bae, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 37, 2002.
- [45] Baker, R. W., U.S. Patent 3, 952, 741, 1976.
- [46] D.O.Kuethe, D.Augenstein, J.D. Gresser, D.L. Wise, *J. Control. Release* 18, 159, 1992.
- [47] Theeuwes, F., The elementary osmotic pump, *J. Pharm. Sci.*, 64, 1987.
- [48] M.E.Byrne, K.Park, and N.A.Peppas. Synthesis and characterization of biodegradable elastic hydrogels based on poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone) blocks. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 149, 2002.
- [49] Z. Kabaş, İndometasinin Kalsiyum Klorür İle Çapraz Bağlanmış Sodyum Aljinat Ve Poli(Vinil Alkol) / Sodyum Aljinat Mikrokürelerden Kontrollü Salımı. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2006.
- [50] Harshavardhan, P., Dionysios, D. ve Joshua, S.B., Preparation and Optimization of PMAA- Chitosan- PEG Nanoparticles for Oral Drug Delivery. H. Pawar et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90:102– 108, 2012.
- [51] Verma, N. ve Chattopadhyay, P. Preparation of Mucoadhesive Patches for Buccal Administration of Metoprolol Succinate: In Vitro and In Vivo Drug Release and Bioadhesion. *Trop J. Pharm. Res.*, 11-1, 2012.
- [52] Welling, P.G., Oral Controlled Drug Administration, Pharmacokinetic Consideration. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 9 (7), 1185-1225, 1983.

- [53] Colombo P., Peppas N.A., Bettini R., Catellani P.L., Santi P., Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxy propyl methyl cellulose matrices containing a soluble drug. *Europ. J. of Pharm. Sci.*, 9, 33-40, 1999.
- [54] Liu, Y., Yang, L., J. Li, J., Grafting of methly methacrylate onto sodium alginate initiated by potasium ditelluratoargentate(III). *J.Appl. Polym. Sci.*, 97 (4), 1688, 2005.
- [55] B. Dortunç, Oral Sistemler, Kontrollü Salım Sistemleri. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 151-175, 2002.
- [56] E. Bulut, Donepezil Hidroklorür'ün Sodyum Aljinat, Sodyum Aljinat/Sodyum Karboksimetil Selüloz ve Sodyum Aljinat/Sodyum Karboksimetil Selüloz/Poli(Vinil Alkol)-aşı-Akrilamid Mikrokürelerden Salımı. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2011.
- [57] D. Onur, İndometasinin, Gluteraldehit ile Çapraz Bağlanmış NaAlg ve Poli(vinilalkol)/NaAlg Mikrokürelerden Kontrollü Salımı. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2005.
- [58] Ommaty R.: *Vademecum*, 22. Baskı, Hacettepe Tas, Ankara, 927, 2005
- [59] Palmer, D. E., Mierke, D. F., Pattaroni, C., Goodman, M., Wakamiya, T., Fukase, K., Kitazawa, M., Fujita, H and Shiba, T. :Interactive NMR and computer simulation studies of lanthionine ring structures. *Biopoly.* 28, 397-408, 1989.
- [60] Papadimitriou E., Buckton G., Efentakis M.: Probing the mechanism of swelling of hydroxypropylmethylcellulose matrices. 12th Pharm. Tech. Conf., Elsinore, Denmark, March 30th- April 1st, 43-55, 1993.
- [61] Pham A. T., Lee P. I.: Probing the mechanism of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices. *Pharm. Res.*, 11 (10): 1379-1385, 1994.
- [62] Ayhan H., Yeni ufuklara biyomalzemeler, *Bilim Teknik Dergisi*, 11, 7, 2002.
- [63] Rinaudo M., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Poly. Sci.*, 31 (7): 603-632, 2006.
- [64] Hrouz, J., Ilavsky, M., Ulbrich, K., Kopecek, J., The photoelastic behaviour of dry and swollen networks of poly(N, N-diethylacrylamide) and of its copolymer with N-tert. Butylacrylamide. *Euro. Poly. J.* 17, 361-366, 1981.

- [65] Bian, F., Liu, M., Complexation between poly(N,N-diethylacrylamide) and poly(acrylic acid) in aqueous solution, *Euro. Poly. J.* 39, 1867-1874, 2003.
- [66] Mundargi, R.C., Shelke, N.B., Rokhade, A.P., Patil, S.A., Aminabhavi, T.M., Formulation and in-vitro evaluation of novel starch-based tableted microspheres for controlled release of ampicillin. *Carbohydr. Poly.* 71, 42-53, 2008.
- [67] Chaturvedi, K., Kulkarni, A.R., Aminabhavi, T.M., Blend microspheres of poly(3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate phthalate for colon delivery of 5-Fluorouracil. *Indus. Engin. Chem. Res.* 50, 10414-10423, 2011.
- [68] Kevadiya, B.D., Patel, T.A., Jhala, D.D., Thumbar, R.P., Brahmbhatt, H., Pandya, M.P., Rajkumar, S., Jena, P.K., Joshi, G.V., Gadha, P.K., Tripathi, C.B., Bajaj, H.C., Layered inorganic nanocomposites: a promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU). *Euro. J. Pharm. and Biopharm.* 81, 91-101, 2012.
- [69] Gopi D., Bhuvaneshwari N., Indira J., Kavitha L., Synthesis and spectroscopic investigations of hydroxyapatite using a green chelating agent as template *Spectr. Acta A* 104, 292–299, 2013.
- [70] Chen J., Liu M., Jin S., Liu H., *Polym. Adv. Technol.*, 19, 1665-1663, 2008.
- [71] Moreira R.B., Teixeira J.A., Furuyama-Lima A.M., N.C.de Souza, Siqueira Preparation A.B., characterization and evaluation of drug-delivery systems: Pectin and mefenamic acid films. *Thermo. Acta*, 590, 100–106, 2014.
- [72] Gupta Kumar Vinod, Pathania D., Asif M., Sharma G., Liquid Phase Synthesis of pectin-cadmium sulfide nanocomposite and its photocatalytic and antibacterial activity. *J. of Mol. Liquids*, 196, 107-112, 2014.
- [73] Vriesmann, L.C., Petkowicz, C.L.O., Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): structural characterization of a pectic fraction. *Carbohydr. Polym.*, 77, 72–79, 2009.
- [74] Cui S. W., Chang Yoon Hyuk, Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin, *LWT - Food Sci. and Techn.* 58, 396-403, 2014.
- [75] Marana J. Prakash, Sivakumar V., Thirugnanasambandhama K., Sridhar R., Optimization of microwave assisted extraction of pectin from, *Carbohydr. Polym.* 97, 703–709, 2013.

- [76] Ma S., Wang Z., Pulsed electric field-assisted modification of pectin from sugar beet pulp, *Carbohydr. Polym.* 92, 1700–1704, 2013.
- [77] Burana-osot J., Soonthornchareonnon N., Hosoyama S., Linhardt J. R., Toida T., Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction, *Carbohydr. Res.* 345, 1205–1210, 2010.
- [78] Spevacek J., Geschke D., Ilavsky M., ^1H NMR study of temperature collapse of linear and crosslinked poly(N,N-diethylacrylamide) in D₂O. *Polym.*, 42, 463–468, 2001.
- [79] Almeida E. A.M.S., Facchi P. S., Martins F. A., Nocchi S., Ivânia T.A. Schuquela, Celso V. Nakamura, Adley F. Rubiraa, Edvani C. Muniz, Synthesis and characterization of pectin derivative with antitumorproperty against Caco-2 colon cancer cells. *Carbohydr. Polym.* 115, 139–145, 2015.
- [80] Jose R.R.S., Jose' I.X.C., Maria T.S.T., Regina C.M.P., Na' gila M.P.S.R., Judith P.A.F., Chitosan-coated pectin beads: Characterization and in vitro release of mangiferin, *Food Hydrocolloids* 23, 2278–2286, 2009.
- [81] Wu M.C., Chen Ya-W., Hwang J.-Yu, Lee B.H., Chang H.M., Transacylation of citrus pectin as catalyzed by pectinesterase from tendril shoots of chayote. *Food Res. Intern.* 37, 759–765, 2004.
- [82] Zhang L., Shi Z., Shangguan W., Fang Y., Nishinari K., Phillips G.O., Jiang F., Emulsification properties of sugar beet pectin after modification with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids*, 43, 107-113, 2015.
- [83] Gonçalves da S.A.M.P.S., Lopes Sonia I.C., Brogueira P., Prazeres T.J.V., Beija M., Martinho J.M.G., Thermo-responsiveness of poly(N,N-diethylacrylamide) polymers at the air-water interface: The effect of a hydrophobic block. *J. of Coll. and Inter. Sci.* 327, 129-137, 2008.
- [84] Şanlı O., Aytemiz S., Ünal H.İ., Graft copolymerization of acrylamide on swollen poly(ethylene terephthalate) fibers using cerium ammonium nitrate initiator. *J.M.S.-Pure Appl. Chem.*, A34(6), 1003-1015, 1997.
- [85] Pourjavadi A., Mahdavinia G.R., Zohuriaan-Mehr M.J., Omidian H., Modified ChitosanI. Optimized Cerium Ammonium Nitrate-Induced Synthesis of Chitosan-graft-Polyacrylonitrile. *J. of Appl. Polym. Sci.* (88), 2048–2054 (2003).

- [86] Lutfor R., Silong S., Wan Md Zin, M. Zaki Ab R., Mansor A., Jelas H., Graft Copolymerization of Methyl Acrylate onto Sago Starch Using Ceric Ammonium Nitrate as an Initiator. *J. of App. Polym.* 76, 516-523, 2000.
- [87] Li, D., Han, B.; Liu, Z. Grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate onto isotactic polypropylene using supercritical CO₂ as a solvent and swelling agent. *Macromol. Chem. Phys.* 202, 2187-2194, 2001.
- [88] N. Işıklan, F. Kurşun, Sodyum aljinat üzerine itakonik asit aşılınması ve aşı kopolimerlerin ilaç salım sistemlerinde kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, 57, 2008.
- [89] Trivedi J. H., Thaker M.D., Trivedi C. Harikrishna, Photo-Induced Graft Copolymerization of Acrylonitrile onto Sodium Salt of Partially Carboxymethylated Guar Gum, *J. Apply. Polym. Sci.* , 41371, 2014.
- [90] Sharma Brij Raj, Kumar Vineet , Soni P.L., Carbamoylethylation of cassia tora gum. *Carbohydr. Polym.* 54,143–147, 2003.
- [91] Thirugnanasambandham K., Sivakumar V., Maran J. Prakash, Process optimization and analysis of microwave assisted extraction of pectin from dragon fruit peel. *Carbohydr. Polym.* 112, 622–626, 2014.
- [92] Roeges, N.P.G., A guide to the complete interpretation of Infrared spectra of organic structures. Wiley Chichester. 1994.
- [93] Lan J., Qing L., Zhiyong S., Xueyun N., and Min W., Preparation of 5-Fluorouracil/_Cyclodextrin Complex Intercalated in Layered Double Hydroxide and the Controlled Drug Release Properties. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 11176–11181, 2009.
- [94] Cheng Z., Guodong L., Yihan W., Fuying C., Jien Z., Qingshan H., Preparation and characterization of 5-fluorouracil- loaded PLLA–PEG/PEG Nanoparticles by a novel supercritical CO₂ technique. *Intern. J. of Pharm.* 436, 272– 281, 2012.
- [95] Mucha M. J., Wieczorek P. A., Characterisation and morphology of biodegradable chitosan/synthetic polymerblends. *Macromol. Symp.* 144, 391-412, 1999.
- [96] Nasr M., Ghorab M.K., Abdelazem A., Invitroand in vivo evaluation of cubosomes containing 5-fluorouracil for livertargeting. *Acta Pharm. Sinica* (1) 79–88, 2015.

- [97] Ramesh B.V., Malladi S., Kallappa M.H., Tejjaraj M.A., Development of 5-fluorouracil loaded poly(acrylamide-co-methylmethacrylate) novel core-shell microspheres: In vitro release studies. *Intern. J. of Pharm.* 325, 55–62, 2006.
- [98] Posé S., Kirby A.R., Mercado José A., Morris V.J., Quesada M.A., Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydr. Polym.* 88, 882– 890, 2012.
- [99] Tummalapalli M., Deopura B.L., Alam M.S., Gupta B., Facile and green synthesis of silver nanoparticles using oxidized pectin. *Materials Sci. and Engine. C* 50, 31–36, 2015.
- [100] İ., Şişman., Cds, Cdse ve Cdte bileşik yarıiletken ince filmlerinin aynı çözültiden elektrokimyasal olarak Au(111) elektrodu üzerinde büyütülmesi ve afm, stm, xrd ve UV-VIS spektroskopisi ile karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Doktora Tezi, 111-116, 2006.
- [101] Mellati, A., Valizadeh Kiamahalleh, M., Dai, S., Bi, J., Jin, B., Zhang, H., Influence of polymer molecular weight on the in vitro cytotoxicity of poly(N-isopropylacrylamide). *Mat. Sci. Engineer. C* 59, 509-513, 2016.
- [102] Lenka H., Spevacek R., Marek R., Alexander Z., Hana K., Zden S. Phase transition in hydrogels of thermoresponsive semi-interpenetrating and interpenetrating networks of poly(N,N-diethylacrylamide) and polyacrylamide. 85, 1-13, 2016.
- [103] Isıklan N., Küçükbalcı G., Microwave-induced synthesis of alginate–graftpoly(N-isopropylacrylamide) and drug release properties of dual pH- and temperatureresponsive beads, *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 82, 316– 331, 2012.
- [104] Chen C., Mingzhu L., Chunmei G., Shaoyu L., Jiucun C., Xiyong Y., Enyong D., Chuanming Y., Jing G., Guiji C., A convenient way to synthesize comb-shaped chitosan-graft-poly (N-isopropylacrylamide) copolymer. *Carbohydr. Polym.* 92, 621– 628, 2013.
- [105] Yu Y.L., Xie R., Zhang M.J., Li Peng-F., Yang L., Ju Xiao-Jie, Chu Liang-Yin, Monodisperse microspheres with poly(N-isopropylacrylamide) core and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) shell. *J. of Coll. and Inter. Sci.* 346, 361–369, 2010.

- [106] Kidchob Tongjit, Kimura Shunsaku , Imanishi Yukio, Thermoresponsive release from poly(Glu(OMe))-block-poly(Sar) microcapsules with surface-grafting of poly(N-isopropylacrylamide), *J. of Controll. Rel.* 50, 205–214, 1998.
- [107] Denkbaş E. B., Seyyal M., Pişkin E., 5-fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. 16, 741-749, 1999.
- [108] Zinutti C. Hoffman M. Influence of the casting solvent on the physico chemical properties of 5-fluorouracil loaded microspheres. *Intern. J. Pharm.* 133, 97-105, 1996.
- [109] Ramesh C.N., Rakesh K., Pandit J.K., Chitosan coated sodiumalginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FUfor ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. *Euro. J. of Pharm. Sci.* 47, 678–685 2012.
- [110] Das S., Chaudhury A., Ka-Yung N., Preparation and evalution of zinc-pectin-chitosan composite particles for drug delivery to the colon: Role of chitosan in modifying in vitroand in vivo drug release. *Inter. J. of Pharm.* 406, 11-20, 2011.
- [111] Chandy T. Das G.S. Rao G.H.R. 5-fluorouracil-loaded chitosan coated polylacticacid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebraltumours. *J. of Micro.*, 17, 625-638, 1999.
- [112] Carelli V., Dicolo, G., Effect of different water soluble additives on water sorption into siliconerubber. *J. of Pharm. Sci.*72, 316-317, 1983.
- [113] Carbinatto F.M., Ana Do'ris de C., Evangelista Raul C.,Cury Beatriz S.F., In sights in to the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amyloses tarchmatrices. *asian J. of Pharm. Sci.* 9, 27-34, 2014.
- [114] Baimark Y., Srisuwan Y., Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca^{2+} post-cross-linking, *Advanced Powder Technology* 25, 1541–1546, 2014.
- [115] Peng Z., Li Z., Shen Y., Preparation and in vitro characterization of gelatin microspheres containing 5-fluorouracil. *J. of Macro. Sci.* 51, 1117-1124, 2012.

[116] Ranjha M.N., Jahanzeb M., Sheikh Z.Z., Synthesis and characterization of pH-Sensitive pectin/acrylicacid hydrogels for verapamil release study, *Iranian Poly. J.* 20, 147-159, 2011.

[117] Yuan Y., Chesnutt B.M., Utturkar G., Haggard W.O., Yang Y., Ong J.L., Bumgardner J.D., The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr. Polym.* 68, 561–567, 2007.

[118] Ferrero C., Jiménez-Castellanos M.R., In vitro release testing of matrices based on starch–methyl methacrylate copolymers: Effect of tablet crushing force, dissolution medium pH and stirring rate. *Inter. J. of Pharm.* 461, 270–279, 2014.

