

Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

Fabrication of Chlorogenic Acid Loaded PLGA Nanoparticles and Determination of Antimicrobial Activity

Yasemin Budama-Kılınc 

Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

öz

Amaç: Tüm dünyada gıda endüstrisinde kullanılan kimyasal koruyucu maddelerin zararlı etkileri konusunda ciddi endişeler söz konusudur. Bu çalışmanın amacı, nutrasötik madde olan klorojenik asit bazlı kontrollü salım sisteminin üretimi ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesidir.

Yöntem: Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri çift emülsiyon yöntemi ile sentezlenmiş, Zeta Sizer cihazı ile karakterize edilmiş, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Ayrıca klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin gıda patojenlerinden olan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) ve *Listeria monocytogenes* (ATCC 10033) üzerindeki antimikrobiyal etkinliği mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir.

Bulgular: Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutunun 228.5 ± 27.8 nm, polidispersite indeksinin 0.127, zeta potansiyel değerinin -4.87 ± 4.82 mV olduğu bulunmuştur. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon veriminin %99, yükleme veriminin ise %68 olduğu hesaplanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde 62.5 ± 0.024 µg/mL ve *Salmonella Typhimurium* üzerinde 62.5 ± 0.111 µg/mL ve *Listeria monocytogenes* üzerinde 125 ± 0.097 µg/mL konsantrasyonlarında inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç: Kontrollü salım özelliği ile klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium* üzerindeki antimikrobiyal etkisinin önemli düzeyde arttığı, *Listeria monocytogenes*'de ise daha az etki gösterdiği belirlenmiştir. Üretilen nanopartiküllerin ileriki çalışmalar ile gıda alanında koruyucu olarak kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Klorojenik asit, nanopartikül, antimikrobiyal

ABSTRACT

Objective: There are serious concerns about the harmful effects of chemical preservatives used in the food industry all over the world. The aim of this study is to determine the antimicrobial activity of controlled release system based on chlorogenic acid as a nutraceutical agent.

Method: Chlorogenic acid-loaded PLGA nanoparticles were synthesized by double emulsion method and characterized by Zeta Sizer device. The encapsulation efficiency and loading capacity were determined. In addition, antimicrobial activity of chlorogenic acid-loaded PLGA nanoparticles on food pathogens *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 10033) was investigated by microdilution method.

Results: PLGA nanoparticles with chlorogenic acid loaded was found an average particle size of 228.5 ± 27.8 nm, a polydispersity index of 0.127, and a zeta potential of -4.87 ± 4.82 mV. It was calculated that the encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles loaded with chlorogenic acid was 99% and the loading efficiency was 68%. *Pseudomonas aeruginosa* on 62.5 ± 0.024 µg/mL and *Salmonella Typhimurium* on 62.5 ± 0.111 µg/mL, and *Listeria monocytogenes* 125 ± 0.097 µg/mL concentrations were found to show inhibitory effect.

Conclusion: It was determined that the antimicrobial effect of the chlorogenic acid-loaded PLGA nanoparticles on the *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium* increased significantly and the results showed less antimicrobial effect on *Listeria monocytogenes*. It is thought that the produced nanoparticles may have the potential to be used as a preservative in the field of food with further studies.

Keywords: Chlorogenic acid, nanoparticle, antimicrobial

Alındığı tarih:

02.02.2019

Kabul tarihi:

27.02.2019

Ç. içi yayın tarihi:

25.03.2019

ORCID Kayıtları

Y. Budama-Kılınc 0000-0003-0601-3091

✉ yaseminbudama@gmail.com

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Günümüzde hâlen dünya çapında gıdaların mikrobiyolojik güvenliği; tüketiciler, denetleme kurumları ve gıda endüstrisi için sorun olmaya devam etmektedir⁽¹⁾. Gıda endüstrisinde kimyasal koruyucu kullanmanın kanserojenik etkileri hakkında artan endişe, doğal ve bitkisel maddelere olan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır^(2,3). Her ne kadar sentetik antimikrobialler birçok ülkede onaylanmış olsa da son eğilim; alternatif, güvenli, etkili ve kabul edilebilir doğal koruyucuların kullanımı olmuştur⁽¹⁾. Böylece, gıda ürünlerinde sentetik kimyasal koruyucuların kullanılması yerine, tüketici tarafından kabul edilebilir doğal antimikrobiallerin tanımlanması değerli hâle gelmiştir⁽⁴⁾. Birçok bitki ekstraktı, bir dizi bakteri, maya ve küfe karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Özellikle fenolik asitler son zamanlarda, anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikleriyle ilgili umut vermektedir^(2,5,6).

Klorojenik asit; elma, armut, kakao, kahve, turuncgiller gibi bazı bitki türlerinde bulunan önemli fenolik bileşiklerden biridir^(4,7). Anti-bakteriyel, antioksidan, antiviral, anti-diyabetik ve anti-kanserojen özellikleri klorojenik asitin birçok hastalığın tedavisinde nutrasötik ajan olarak kullanımını ön plana çıkartmıştır^(8,9). Tüm bunların yanı sıra klorojenik asitin bakteri, maya, küf, virüs ve amipler de dâhil olmak üzere çok çeşitli organizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermesi gıda katkı maddesi olarak da kullanım avantajı sağlamaktadır⁽⁴⁾.

Literatürde bazı çalışmalarda, klorojenik asidin, gıda ürünlerinin korunmasında yararlı antimikrobiyal madde olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir⁽⁴⁾. Ancak, literatürde şu ana kadar klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri ile bir çalışma yapılmamıştır.

Günümüzde nanoteknoloji birçok alanda kullanılmakla birlikte, gıda endüstrisinde kullanımı hızla büyümektedir. Nanoenkapsülasyon yöntemleri kullanılarak kararsız olan antimikrobiallerin korunması, gıdaların kalitelerinin ve güvenliklerinin artırılması

söz konusu olmaktadır⁽¹⁰⁻¹³⁾. Ayrıca enkapsülasyon ile gıda katkı maddesinin stabilitesi artırılabilir ve antimikrobiyal aktivite kaybı da önenebilmektedir⁽¹⁴⁾. Enkapsülasyon için kitosan gibi biyopolimerler kullanılabilmesinin yanı sıra PLGA gibi FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından onaylı polimerler de tercih edilmektedir⁽¹⁵⁾.

Bu çalışmada, gıda teknolojilerinde kullanılması amacıyla, alternatif bir yaklaşım olarak klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Ayrıca klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin gıda patojenlerinden olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği, klorojenik asit ve boş PLGA nanopartikülleri ile kıyaslı bir şekilde test edilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klorojenik asit (Mw~354 g/mol) Thermo Fisher'dan (ABD), poli(D,L-laktik-ko-glikolik) asid (PLGA) (50:50, Mw~38-54 kDa), diklorometan (DCM) ve polivinil alkol (PVA) Sigma-Aldrich'den (ABD) satın alınmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar ve solventler analitik safliktadır. Ultra saf su Millipore MilliQ Gradient sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller literatürde ayrıntılı şekilde belirtilen ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (su/yağ/su, w/o/w) kullanılarak üretilmiştir^(16,17). Nanopartiküllerin üretimi için 100 mg PLGA, 6 mL diklorometan içerisinde çözündürülmüştür. 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanan klorojenik asit çözeltisinden önceden hazırlanan PLGA çözeltisinin üzerine 2 mL eklenmiştir ve 3 dk. boyunca 70 W enerji altında sonikasyon uygulanarak homojenize edilmiş ve emülsiyon (w/o) oluşturulmuştur. %5'lik PVA distile suda çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen PLGA klorojenik asit emülsiyonu %5'lik PVA çözeltisine çok küçük damlalar hâlinde homojen bir şekilde eklen-

miştir. Bu işlem sonrasında karışım 5 dk. boyunca 70 W enerji altında yine sonikasyon uygulanarak homojenize edilmiş ve ikili emülsiyon (w/o/w) oluşturulmuştur. Elde edilen nanopartiküllerden solventin uzaklaştırılması için 16 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır. Ertesi gün nanopartiküller üç kez safsızlıkların uzaklaştırılması için 10.000 rpm 45 dk. santrifüj edilerek nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen nanopartiküller 1:200 oranında sulandırıldıktan sonra 0.45 µm'lik rejenere selüloz filtreden geçirilmiş ve karakterizasyon işlemleri için hazır hâle getirilmiştir.

Boş PLGA nanopartikülleri ise içerisine klorojenik asit çözeltisi eklenmeden aynı basamaklardan geçirilerek hazırlanmıştır.

Klorojenik Asitin Standart Eğrisinin Hazırlanması

Klorojenik asit suda (~70°C) çözündürülerek (0.195313; 0.390625; 0.78125; 1.5625; 3.125; 6.25; 12.5; 25 µg/mL) için 8 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. UV-Vis spektrometre yardımı ile her bir konsantrasyonun UV absorbans değeri (324 nm'de) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan konsantrasyona karşılık absorbans grafiği çizilmiştir (Şekil 3). Enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesinin belirlenmesi için eğrinin denklemi elde edilmiştir.

Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon verimini belirlemek için, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin santrifüj aşamasından sonra süpernatant alınmıştır ve içerisindeki serbest klorojenik asit miktarı UV-Vis spektrometreden elde absorbans değeri klorojenik asitin standart eğrisinden elde edilen doğru denklemine yazılarak hesaplanmıştır. UV-Vis ölçümünde boş PLGA nanopartikülleri kör olarak kullanılmıştır. Enkapsülasyon verimi Denklem 1 kullanılarak hesaplanmıştır. Klorojenik asit PLGA nanopartikülleri için yükleme kapasitesi ise Denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

Denklem 1.

$$\% \text{ Enkapsülasyon} = \frac{\text{PLGA Nanopartiküllerindeki Klorojenik Asit Miktarı} - \text{Serbest Klorojenik Asit Miktarı}}{\text{PLGA Nanopartiküllerindeki Klorojenik Asit Miktarı}} \times 100$$

Denklem 2.

$$\% \text{ Yükleme Kapasitesi} = \frac{\text{Enkapsüle Edilmiş Klorojenik Asit Miktarı}}{\text{Toplam Nanopartikül Ağırlığı}} \times 100$$

Dinamik Işık Saçılması ve Zeta Potansiyel Analizi

Üretilen nanopartiküllerin zeta potansiyel, polidispersite indeksi ve boyut ölçümü için Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Partiküller ölçüm yapmak için transparan küvete konulmuştur ve 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) ile 25°C'de ölçüm alınmıştır. Her bir örnek fosfat tamponu ile hazırlanmıştır ve ölçümden önce 0.45 µm'lik rejenere selüloz membrandan filtre edilmiştir. Partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi 10 ölçümün ortalaması alınarak raporlanmıştır.

Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin İn Vitro Salım Profili

Klorojenik asitin in vitro salım profilini belirlemek için klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri distile suda disperse edilerek diyaliz kapsülüne yerleştirilmiştir. Salım ortamı olarak fosfat tamponu (PBS) (pH=7.2) kullanılmıştır. Örnekler 100 rpm'de yatay çalkalamalı su banyosunda 37°C'de inkübe edilmiştir. Klorojenik asitin in vitro salım profili 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saatlik zaman aralıkları ile belirlenmiştir. Salım ortamından 1 mL örnek alınmıştır ve yerine ise aynı hacimde taze salım ortamı eklenmiştir. Alınan örnekler UV-Vis spektrometre ile analiz edilerek, zamana bağlı olarak nanopartikülden salınan klorojenik asit miktarı standart eğri yardımı ile Denklem 3 kullanılarak elde edilmiştir.

Denklem 3.

$$\text{Salım (\%)} = \frac{\text{Salınan Klorojenik Asit Miktarı}}{\text{Toplam Klorojenik Asit Miktarı}} \times 100$$

Bakteriyel Suşlar ve Büyüme Koşulları

Antimikrobiyal testler Nanomik Biyoteknoloji A.Ş. laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalar [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 10033)], ticari olarak firma tarafından sağlanmıştır. Bakteri suşları, Luria-Bertani (LB) besiyerinde (Miller, Merck 1102850500)

37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmaların iyi bir şekilde büyümesine izin verdiği için LB besiyeri deneyler için yeğlenmiştir⁽¹⁸⁾.

Antibakteriyel Etkinlik Testleri ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Örneklerin belirtilen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivite ve MİK değerleri, bazı modifikasyonlar ile mikrodilüsyon yöntemi ile 96'lık mikropak kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁽¹⁹⁾. Örnekler LB broth ile seyreltilmiştir ve 62.5; 125; 250; 500 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda mikropaklara kuyucuklarına eklenmiştir. Test edilen mikroorganizmaların son konsantrasyonları 0.5 Mc Farland (1.5×10^8 CFU/mL) standartları mikropaklara kuyucuklarına eklenmiştir ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon öncesinde ve sonrasında mikropakanın absorbans değeri 600 nm dalga boyunda spektrometre (Biotek-Epoch 2, ABD) ile ölçülmüştür. Kullanılan örneklerin test edilen mikroorganizmaların üzerinde büyümesini inhibe eden en düşük konsantrasyonu MİK olarak tanımlanmıştır.

İstatistik Analiz

Muameleler ve antimikrobiyal etkiler arasındaki farklılıkları ortaya koyan verilere tek faktörlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Varyans analizlerinin uygulanmasında Minitab (Ver. 2001) ve Duncan çoklu karşılaştırma analizlerinde de MSTAT-C (Ver. 1979)

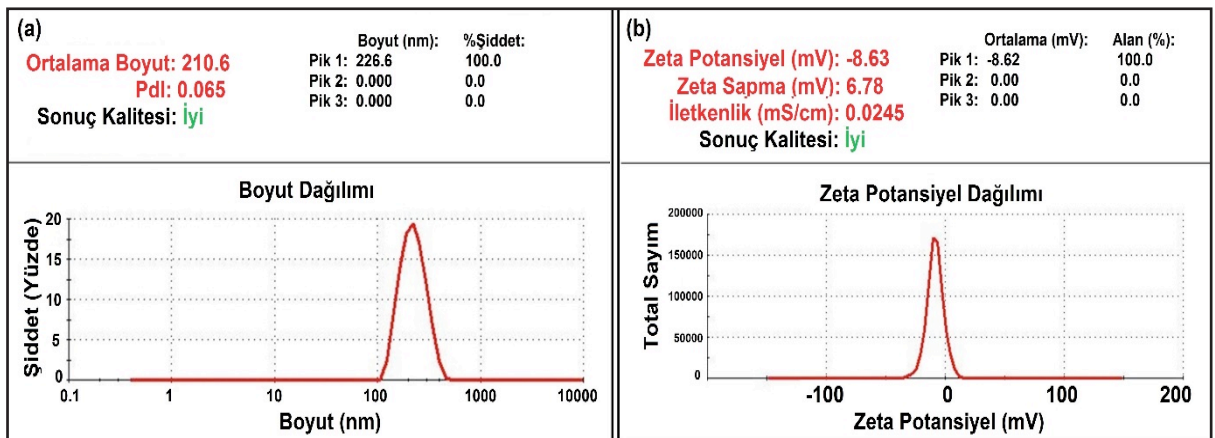
paket programlarından yararlanılmıştır.

BULGULAR

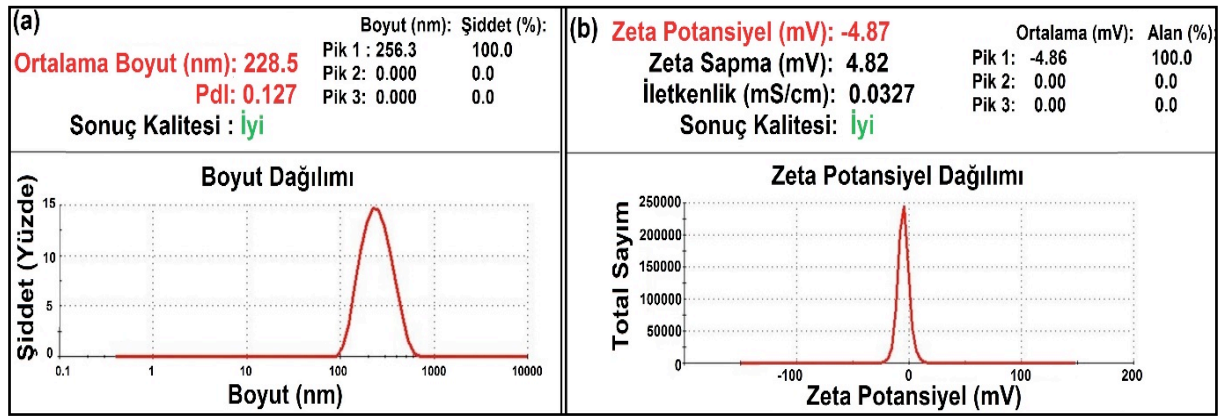
Dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi sıvı içerisindeki nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımlarını in situ değerlendirmeye olanak tanıyan en kullanışlı deneysel tekniklerden biridir. Bu çalışmada, çift emülsiyon (w/o/w) yöntemi ile üretilen klorojenik asit yüklü PLGA ve boş PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersite indeksi analizleri Zeta Sizer cihazı ile yapılmıştır.

Şekil 1'de boş PLGA nanopartiküllerine ait boyut ve zeta potansiyel sonuçları görülmektedir. Boş PLGA nanopartikülleri, 210.6±16 nm'lik ortalama partikül boyutu ve 0.065'lik polidispersite indeksi değerleri ile dar bir boyut dağılımına sahiptir (Şekil 1a). Şekil 1b'de ise boş PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerinin -8.63±6.78 mV olduğu görülmektedir.

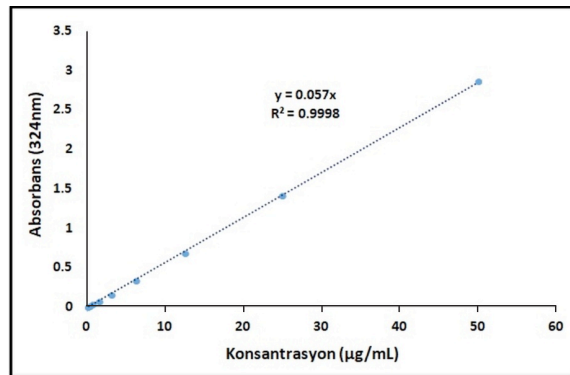
Şekil 2'de ise klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerine ait zeta sizer cihazı sonuçları verilmektedir. Şekil 2a'da görüldüğü üzere, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutu 228.5±27.8 nm ve polidispersite indeksinin ise 0.127 olduğu bulunmuştur. Şekil 2b'de ise klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerinin -4.87±4.82 mV olarak ölçüldüğü görülmektedir. Üretilen nanopartiküllerin zeta sizer cihazı ile parti-



Şekil 1. Boş PLGA nanopartiküllerinin Zeta Sizer sonuçları (a) ortalama partikül boyutu, (b) zeta potansiyel.



Şekil 2. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin Zeta Sizer sonuçları. (a) ortalama partikül boyutu, (b) zeta potansiyel.



Şekil 3. Klorojenik asitin standart eğrisi.

kül oluşumu karakterize edildikten sonra, klorojenik asit PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi belirlenmesi için klorojenik asitin standart eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 3). Bunun için UV-Vis spektrometre ile 324 nm'de klorojenik asitin 8 farklı konsantrasyondaki çözeltisi için absorbans değerleri belirlenmiştir. Klorojenik asitin her bir konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değeri için grafik çizilmiştir ve doğru denklemi bulunmuştur.

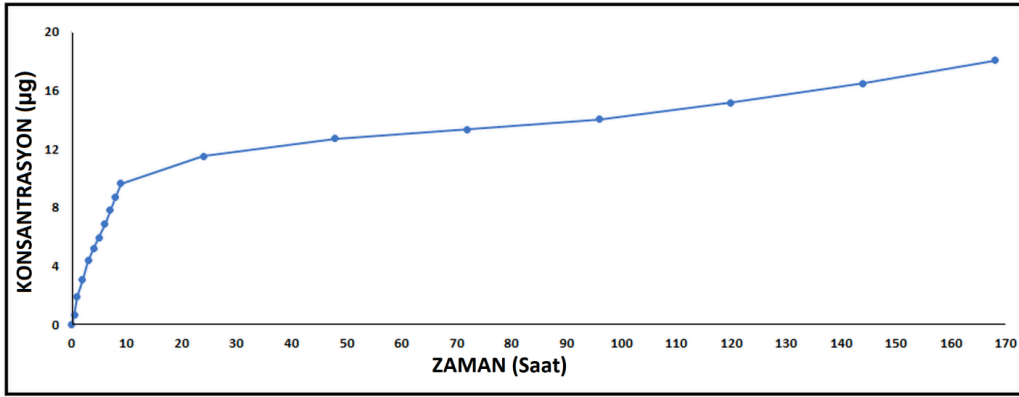
Klorojenik asitin enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesini hesaplamak için standart eğri kullanılmıştır. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri üretilirken santrifüj aşamasında süpernatanttaki klorojenik asit konsantrasyonu belirlenmiştir ve Denklem 1 yardımıyla enkapsülasyon verimi % 99 olarak hesaplanmıştır. Klorojenik asitin yükleme verimi ise Denklem 2 kullanılarak %68 olarak hesaplanmıştır. Bu değer

anlamı, her 1 mg klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri 0.68 mg klorojenik asit içerdiğini göstermektedir. Enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi değerleri klorojenik asitin enkapsüle edildiğini ve klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir.

Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım sonuçları, Şekil 4'te verilmiştir. İn vitro kontrollü salım sonuçlarına göre 24 saat içerisinde, klorojenik asitin 12 µg/mL serbest bırakıldığı ve klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin ilerleyen 7 gün içinde yavaş bir serbest bırakma profili gösterdiği bulunmuştur.

Klorojenik asit, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülü ve boş PLGA nanopartiküllerinin Tablo 1'de belirtilen gıdalar patojenlerinden olan üç farklı bakteri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve MİK değerleri belirlenmiştir.

Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin yükleme verimi hesabı doğrultusunda 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri (62.5; 125; 250; 500 µg/mL) içerisindeki klorojenik asit miktarı sırasıyla 42.5; 85; 170 ve 340 µg olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada, aynı miktarda örnek hacmi kullanılmasına karşın, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin az miktarda klorojenik asit içerdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım profili.

Tablo 1. Klorojenik asit, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülü ve boş PLGA nanopartikülünün bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri. Tablodaki sayılar üç tekrarlı deneyler sonucu elde edilen ortalama \pm standart sapma (SD) değerleridir.

Bakteri	MİK (µg/mL)		
	Boş PLGA Nanopartikül [†]	Klorojenik Asit	Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartikülü
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>500 \pm 0.106	62.5 \pm 0.01 ^{A,a}	62.5 \pm 0.024 ^{A,b}
<i>Salmonella Typhimurium</i>	>500 \pm 0.085	62.5 \pm 0.01 ^{A,a}	62.5 \pm 0.111 ^{A,b}
<i>Listeria monocytogenes</i>	>500 \pm 0.106	62.5 \pm 0.01 ^{B,a}	125 \pm 0.097 ^{A,a}

^{A-B} Aynı satırdaki farklı harfler, muameleler arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunduğunu göstermektedir.

^{a-b} Aynı sütundaki farklı harfler, patojenler üzerine antimikrobiyal etkiler arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunduğunu göstermektedir.

[†] Boş PLGA nanopartikül muamelesi, istatistiksel analize dâhil edilmemiştir.

Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin antimikrobiyal etkisi, tek başına klorojenik asitin antimikrobiyal etkisi ile kıyaslandığında, kontrollü salım özelliği ile nanopartiküllerin istatistiksel olarak antimikrobiyal etkiyi arttırdığı belirlenmiştir. Ancak bu antimikrobiyal etki *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium*'a kıyasla *Listeria monocytogenes*'de daha az gözlenmiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

Gıdalardaki mikrobiyal bozulmaların kontrolü için geleneksel olarak birçok gıda koruma stratejisi kullanılmaktadır. Ancak, yiyeceklerin mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonu hâlen yeterince kontrol altına alınamayan bir sorun olmasının yanı sıra bu sorunu çözmek için kullanılan gıda katkı maddelerinin insan sağlığına negatif etkileri de otoriteler tarafından tartışma konusudur.

Literatürde bitkilerden elde edilen doğal ürünler için MİK değeri < 100 µg/mL ise oldukça iyi inhibitör etkisinin olduğu, eğer MİK değeri 100 ila 500 µg/mL arasında ise orta dereceli inhibitör etkisinin olduğu ve MİK değeri > 1.000 µg/mL ise inhibitör etkisinin olmadığı şeklinde belirtilmiştir^(20,21). Tablo 1'deki klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin MİK değerleri incelendiğinde, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium* için < 100 µg/mL olduğundan iyi bir inhibitör etkiye sahip olduğu, ancak *Listeria monocytogenes* için orta dereceli inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir^(20,21).

Klorojenik asitin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Salmonella Typhimurium* üzerindeki MİK değerinin 0.04 mg/mL olduğunu⁽²²⁾, *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki MİK₉₀ değerinin ise 10 mg/mL olduğunu⁽²³⁾, *Listeria monocytogenes* üzerindeki MİK₉₀ değerinin ise 3.54 mg/mL⁽²⁴⁾ olduğunu gösterilmiştir. Literatürdeki tüm bu değerler, bu

çalışmada elde edilen değerler ile kıyaslandığında, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin (62.5; 125; 250; 500 µg/mL'sinin) içerisinde sırasıyla 42.5; 85; 170 ve 340 µg klorojenik asit bulunduğundan, daha az miktarda etken madde kullanılarak üretilen nanopartiküllerin daha etkin antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, anti-bakteriyel, antioksidan, antiviral, anti-diyabetik ve anti kanserojen özelliğe sahip klorojenik asit kullanılarak, klorojenik asit yüklü PLGA nanopartikülleri üretilmiş ve bu nanopartiküllerin karakterizasyon çalışması yapılmıştır. İn vitro salım profili belirlenmiştir ve bu nanopartiküllerin gıdalarda mikrobiyal bozulmaya neden olan üç farklı bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkinliği klorojenik asit ve boş PLGA nanopartikülleri ile kıyaslı bir şekilde incelenmiştir. Klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin gıda alanında koruyucu olarak kullanım potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak ürün olarak klorojenik asit yüklü PLGA nanopartiküllerinin etkin olarak kullanılabilmesi için gıdalardaki penetrasyon, renk ve tat değişikliği, alerjik etkilerin değerlendirilmesi ve mikrobiyotaya deneyleri gibi önem gösteren çalışmaların da gerçekleştirilmesi ileriki çalışmalarda planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol.* 2012;156(1):7-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>
2. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
3. Ekici K, Alisharli M, Sancak YC. Peynir çeşitlerinde nitrit ve nitrozaminler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008;19(2):71-2.
4. Santana-Gálvez J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules.* 2017;22(3):E358. <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>
5. Venditti A, Maggi F, Vittori S, et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of *Achillea tenorii*. *Pharm Biol.* 2015;53(10):1505-10. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.991833>
6. Yun N, Kang J-W, Lee S-M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem.* 2012;23(10):1249-55. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.018>
7. Gil M, Wianowska D. Chlorogenic acids-their properties, occurrence and analysis. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, sectio AA-Chemia.* 2017;72(1):61.
8. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem.* 2005;280(30):27888-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503347200>
9. Zhong C, Wall NR, Zu Y, Sui G. Therapeutic application of natural medicine monomers in cancer treatment. *Curr Med Chem.* 2017;24(34):3681-97. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170714101503>
10. Weiss J, Gibis M. Nano-technology in the food industry. *Ernaehrungs Umschau International.* 2013;60(4):44-51.
11. Donsi F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Sci Technol.* 2011;44(9):1908-14. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>
12. Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development—a food industry perspective. *Trend Food Sci Tech.* 2006;17(10):547-56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>
13. Sekhon BS. Food nanotechnology – an overview. *Nanotechnol Sci Appl.* 2010;3:1-15.
14. Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr.* 1999;50(3):213-24. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>
15. Blanco-Padilla A, Soto KM, Hernández Iturriaga M, Mendoza S. Food antimicrobials nanocarriers. *Scientific World Journal.* 2014;2014:837215. <https://doi.org/10.1155/2014/837215>
16. Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Kecel-Gunduz S, et al. Novel NAC-loaded poly (lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for cataract treatment: preparation, characterization, evaluation of structure, cytotoxicity, and molecular docking studies. *PeerJ.* 2018;6:e4270. <https://doi.org/10.7717/peerj.4270>
17. Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Horzum-Bayir O. The cytotoxicity, characteristics, and optimization of insulin loaded nanoparticles. *Orbital: Electron J Chem.* 2017;9(1). <https://doi.org/10.17807/orbital.v9i1.934>

18. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. 2nd Ed. Wayne, PA, ABD: 2002.
19. Zgoda JR, Porter JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol.* 2001;39(3):221-5.
<https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.221.5934>
20. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1027-31.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>
21. de Almeida WS, de Lima SG, Barreto HM, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). *Ind Crops Prod.* 2018;125:236-40.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.007>
22. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci.* 2011;76(6):M398-M403.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02213.x>
23. Bajko E, Kalinowska M, Borowski P, Siergiejczyk L, Lewandowski W. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT-Food Sci Technol.* 2016;65:471-9.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024>
24. Muthuswamy S, Rupasinghe HV. Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. *J Food Agric Environ.* 2007;5(3/4):81.