

PMMA Nanokapsüllerin Çeşitli Formülasyon Değişkenlerinin Boyut, Morfoloji ve Zeta Potansiyel Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Investigating the Effects of Various Formulation Variables on the Size, Morphology and Zeta Potential of PMMA Nanocapsules

Banu İYİSAN¹ 

¹Boğaziçi Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü, Biyofonksiyonel Nanomalzeme Tasarım Laboratuvarı, 34684, İstanbul, Türkiye

Öz

Bu çalışmanın amacı sağlık uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahip Polimetil Metakrilat (PMMA) nanokapsüllerin çeşitli formülasyon değişkenlerinin boyut, morfoloji ve zeta potansiyel üzerine etkisinin incelenmesi ve buradan elde edilen sonuçlarla formülasyon bileşenleri ile üretim sürecinin iyileştirilmesidir. Çalışmada, PMMA nanokapsüller miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak başarı ile üretilmiş olup, elde edilen nanokapsüllerin karakterizasyonu ise dinamik ışık saçılımı yöntemi, elektroforetik ışık saçılımı yöntemi ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak boyut, zeta potansiyel ve morfolojinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma sürecinde PMMA miktarı artışı nanokapsül boyutunun artmasına neden olmuş ve morfolojinin kapsülden küre formuna dönüşümü görülmüştür. Benzer şekilde sürfaktan miktarının artışı da morfoloji değişimine neden olmuş olup, sürfaktan miktarı azalışı ise boyutu önemli derecede artırmıştır. Çalışmanın bir diğer önemli bulgusu ise pirinç kepeği yağı içeren PMMA nanokapsül formülasyonunun miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile başarı ile üretildiği, ancak miniemülsiyon polimerizasyonunun bu noktada uygun bir üretim yöntemi olmadığıdır. Çalışmanın son adımında, optimum formülasyonu belirlenen PMMA nanokapsüllerinin yüzey özelliklerinin biyolojik perspektif ile iyileştirilmesine odaklanılmıştır. Bu amaçla yenilikçi ve pratik bir yaklaşımla yüzeyin polietilen glikol (PEG) bazlı sürfaktanlar ile kaplanması gerçekleştirilmiştir. Bunun ilerleyen çalışmalarda nanokapsüllerin kan akışında kalış süresini artırma potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Çalışma sürecinde elde edilen üretim süreci ve formülasyonun iyileştirilmesine yönelik tüm bulgular, PMMA nanokapsüllerin sağlık uygulamalarında etkinliğinin artırılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Polimer Nanokapsüller, Nanopartikül Morfolojisi, Polimetil Metakrilat, Zeta Potansiyel, Nanokarakterizasyon

Abstract

The aim of the study is to investigate the effect of various formulation variables on the size, morphology, and zeta potential of PMMA nanocapsules, and to improve the formulation components and production process based on the results obtained. PMMA nanocapsules have been successfully produced using the miniemulsion solvent evaporation method and the characterization of the obtained nanocapsules was conducted by determining the size, zeta potential, and morphology using dynamic light scattering, electrophoretic light scattering methods, and transmission electron microscopy. During the study, an increase in the amount of PMMA led to an enlargement in nanocapsule size and the morphology changed from capsule to spherical form. Similarly, increasing surfactant amounts also changed the morphology, whereas a decrease in surfactant amount significantly increased the size. Another important finding was that PMMA nanocapsules containing rice bran oil could be successfully produced using the miniemulsion solvent evaporation method, yet miniemulsion polymerization was not found to be a suitable production method at this stage. In the final step of the study, the focus was to enhance the surface characteristics of the optimally formulated PMMA nanocapsules from a biological perspective. For this purpose, an innovative and practical approach was employed to coat the surface of the nanocapsules with PEG-bearing surfactants. This has the potential to increase the circulation time of the nanocapsules in the bloodstream in future studies. All findings related to the production process and formulation improvements obtained within the study will contribute to enhance the efficacy of PMMA nanocapsules in future biomedical applications.

Keywords: Polymer Nanocapsules, Nanoparticle Morphology, Polymethyl Methacrylate, Zeta Potential, Nanocharacterization

I. GİRİŞ

Sağlık alanında nanoteknolojinin kullanımı, son yıllarda artan bir ivme ile tıp ve ilaç sektöründe teşhis ve tedaviye yönelik yenilikçi ürünlerin geliştirilmesine olanak vermektedir. Özellikle polimerik nanopartiküller; polimerlerin kimyasal çeşitlilikleri, yüzey, morfoloji ve boyut özelliklerinin nano ölçekteki kontrol olanağı ile ilaç salım uygulamaları, medikal görüntüleme, doku mühendisliği ile aşı formülasyonları gibi birçok ileri düzey kullanım alanı içerisinde yer bulmaktadır.

Polimer nanopartiküller; nanoküre veya nanokapsül morfolojisinde olmak üzere iki farklı şekilde üretilebilir [1]. Polimer nanokapsüller, bir polimer kabuk ile çevrelenmiş sulu veya yağlı bir çekirdek yapıdan oluşmakta olup, nanoküre morfolojisine göre birtakım avantajlara sahiptir. Bu rezervuar tipi nanopartiküller, çok çeşitli ilaçları polimer kabukları içine hapsederek taşıma sırasındaki biyolojik bozunmayı önler ve istenmeyen sızıntıları engeller. Böylece, ilacın hedef noktaya etkin bir şekilde ulaşmasına katkıda bulunurlar. Diğer yandan, polimer nanokapsüllerin hem kabuklarına hem de çekirdek içerisine farklı fizikokimyasal özelliğe sahip moleküller yerleştirilebilir. Bu sayede aynı anda birden fazla tedavi veya tedavi ile teşhisi eş zamanlı sağlayacak farklı kombinasyonlarda nanotaşıyıcı yapılar formüle edilebilir. Ayrıca, polimerlerin fonksiyonel gruplarla modifiye edilme potansiyeli, nanopartikül yüzeyinin uygulamaya yönelik olarak işlevsellik kazanmasını sağlar. Bu durum, nanopartiküllerin biyolojik ortamlarla olan etkileşimlerini makromoleküler mühendislik yoluyla etkin bir şekilde kontrol etmek için temel bir rol oynar. Tüm bu avantajlar nanokapsül morfolojisinin sağlık alanındaki uygulamalarda son yıllardaki artışını ve önemini vurgulamaktadır. Klinik uygulamada başarı için ideal bir nanopartikül yapısının yüksek kapasitede ilaç ve türevlerini taşıma özelliği yanında, hedefli ve kontrollü ilaç salımı ve/veya teşhis özelliği ile kan akışında yeterli dolaşım süresi gibi bir takım anahtar özelliklere sahip olması gerekmektedir [2-6]. Bu ideal duruma ulaşabilmek ancak nanopartiküllerin boyut, yüzey özellikleri, koloidal stabilitesi, formülasyon bileşimi, üretim yöntemi ve koşulları ile morfolojik yapısının hassas ve optimum bir şekilde tasarlanması ile gerçekleştirilebilir.

Polimer nanokapsüllerin üretim yöntemleri arasında miniemülsiyon polimerizasyonu (MEP), miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (MÇBY) [7, 8], katman-katman birleştirme yöntemi (LBL), inorganik nanoparçacıkların şablon olarak kullanıldığı ve polimer ile kaplandıktan sonra polimerizasyon ile polimer oluşumu sağlandıktan sonra inorganik yapının ortamdaki uzaklaştırıldığı çeşitli yöntemler [9-11] dikkat çekmektedir. Diğer yandan, amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden organize olarak oluşturduğu içi sulu çekirdek / polimer membran yapısındaki polimerzomların formülasyonları da bir

başka üretim yöntemi olarak göze çarpmaktadır [12-14]. Üretim yöntemleri nanopartikülün boyut, yüzey özellikleri üzerine etkili olduğu gibi morfolojik yapının nanokapsül veya nanoküre oluşumunda da rol oynamaktadır. Bu yöntemler içerisinde miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ve miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile çok çeşitli polimer nanoküreler, polimer nanokapsüller farklı biyomedikal uygulamalar için üretilmiştir [2]. Nanoteranostik uygulamalar için üretilen bazı ışık duyarlı nanokapsül formülasyonlarında fotoaktif moleküllerin polimerizasyon sürecinde bozunması gibi nedenler, bu tip yapıların miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazır polimerler kullanılarak üretilmesine neden olmuştur [15]. Bu ve benzeri enkapsülasyon süreçlerinin olumsuz etkilenme potansiyeli, üretim yönteminin seçiminde önemli bir rol oynamaktadır. Diğer yandan bu üretim yaklaşımı ile hem su içinde yağ (Y/S) miniemülsiyonu, hem de yağ içinde su (S/Y) miniemülsiyonu hazırlanabilmektedir. Bu da nanokapsül formülasyonunun uygulamaya yönelik olarak hem içi yağlı çekirdek hem de içi sulu çekirdek olarak tasarlanabildiğini göstermektedir.

Miniemülsiyon bazlı üretim yöntemleri uygulanarak çeşitli polimer nanoküreler ve nanokapsüller farklı boyutlarda ve yüzey özelliklerinde üretilebilir. Bunlar içerisinden polimetil metakrilat (PMMA) nanokapsüller, hem hazır PMMA kullanılarak miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile, hem de metil metakrilat (MMA) monomeri kullanılarak polimerizasyon ile üretilebilmektedir. PMMA biyoyumlu bir polimer olup; ortopedik dolgular, ortodonti uygulamaları, katarakt ameliyatları sonrası kullanılan intraoküler lensler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda sıklıkla güvenli bir şekilde kullanılmaktadır [16]. Buna ilaveten, PMMA nanopartiküller aşı uygulamaları [17, 18], ilaç salım sistemlerinde melanoma tedavisi [19], çeşitli antibiyotiklerin taşınımı [20], hücre içine alım çalışmaları [21], nanoteranostik olarak hücre içi sıcaklık sensör uygulamaları [15] ve çeşitli antiseptik moleküllerin taşınması [22] gibi bir çok çalışmada da yer almaktadır. PMMA nanopartiküllerin üretim çeşitliliği ve kolaylığına ilaveten, sağlık alanındaki geniş kullanım alanı, polimerin kimyasal bozunmaya karşı dirençli olması, birçok ilaç ve türevi için yüksek taşıma kapasitesi, biyoyumlu yapısı gibi özellikleri bu yöndeki çalışmaların son yıllarda artmasına neden olmuştur.

Tüm bunların ışığında, bu çalışmanın amacı, Şekil 1'de özetlendiği şekilde sağlık uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahip PMMA nanokapsüllerin çeşitli formülasyon değişkenlerinin boyut, morfoloji ve zeta potansiyel üzerine etkisinin incelenmesi ve buradan elde edilen sonuçlarla formülasyon bileşenleri ile üretim sürecinin iyileştirilmesidir. Morfolojik yapının etkisi ilerleyen çalışmalarda yapının ilaç ve türevlerini taşıma kapasitesine etkili olacak olup, boyut ve zeta

potansiyel özellikleri nanopartiküllerin biyolojik ortam ile etkileşimi ve hücre içine alım özelliklerine etki edecektir. Nanopartiküllerin kan akışında yeterli süre dolaşabilmesi için yüzeyin iyonik olmayan, polietilen glikol (PEG) bazlı sürfaktanlar ile yenilikçi ve kolay bir yaklaşımla modifiye edilmesi de çalışmanın son adımı olarak gerçekleştirilecektir.



Şekil 1. Çalışmanın Şematik Özeti: PMMA Nanokapsüllerin Formülasyon, Üretim Yöntemi, Morfolojik Yapısı ve PEGilasyon Süreci Dahil Yüzey Özelliklerinin İyileştirilmesi

II. MATERYAL VE METOD

2.1. Malzeme

Polimetil metakrilat (PMMA, 350 kDa, 120 kDa, 94.6 kDa, 35 kDa), sodyum dodesil sülfat (SDS, %99, iyonik sürfaktan), metil metakrilat (MMA, 99%), 2,2'-Azobis(2-metilbütironitril) (AIBN, \geq 98%), hegzadekan (99%) Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Kloroform Acros Organics'ten elde edilmiştir. Pirinç kepeği yağı, TEA Natura (TEA Prodotto Naturali di Manzotti P., İtalya) firmasından satın alınmıştır. Lutensol AT 50 toz formunda (iyonik olmayan sürfaktan, alkilpolietilen glikol eter, Mw: 2460 g/mol) BASF firmasından temin edilmiştir. İki farklı molekül ağırlığı ayırma sınırına sahip rejenere selülozdan yapılmış diyaliz membranları (moleküler ağırlık ayırma sınırı 6-8 kDa ve 1 kDa) Carl Roth'tan satın alınmıştır.

2.2. Nanokapsüllerin Sentezi

Nanokapsül sentezi iki yöntem uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki olan miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (MÇBY) Tablo 1'de görülmekte olan PNK1 – PNK8 nanokapsüllerinin üretiminde kullanılmıştır [7, 8, 15]. Sentez şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Tablo 1'de belirtilmiş olan farklı miktarlarda (150, 200 ve 300 mg) PMMA, kloroform (1.8 mL) içerisinde çözülmüş ve bu çözelti, pirinç kepeği yağı (300 mg) ile karıştırılarak emülsiyonun dağılma fazı (iç faz) oluşturulmuştur. Buna paralel olarak, yüzey aktif madde (SDS, 25 mg, 10 mg, 3.5 mg) ultra saf suda (10 mL) çözülerek sürekli faz (dış faz) oluşturulmuştur. Bu iki faz bir saat boyunca 1000 rpm'de karıştırılarak makroemülsiyon elde edilmiştir. Bunu takiben, makroemülsiyon buz soğutması altında sonikatör (Branson Sonikatör W450) ile %90 genlikte 2 dakika boyunca homojenizasyona tabi tutulmuştur (10 saniye darbe/10 saniye mola). Son adımda, elde edilen nanoemülsiyon 30 °C'de 16 saat boyunca 300 rpm'de karıştırılarak kloroform uçurulmuş ve bunu

takiben nanokapsüller fazla SDS'yi uzaklaştırmak amacıyla ultra saf suya karşı diyalize (moleküler ağırlık kesme limiti, MWCO 6-8 kDa) tabi tutularak karakterizasyon için hazır hale getirilmiştir.

İkinci yöntem olarak, miniemülsiyon polimerizasyonu (MEP) Tablo 2'de görülmekte olan PNK9-PNK10 nanokapsüllerinin sentezi için uygulanmıştır [7, 8, 23]. Bu amaçla metil metakrilat (MMA, 1 g) monomeri nötr alüminyum oksit üzerinden geçirilerek saflaştırılmış ve ardından başlatıcı olarak kullanılan AIBN (44 mg) ve nanokapsül çekirdek malzemesi olarak enkapsüle edilmesi planlanan yağ fazı ile karıştırılmıştır. Kullanılan yağ fazı PNK9 için sadece pirinç kepeği yağı olup (2 g), PNK10 için ise eşit miktarlarda pirinç kepeği yağı (1g) ve hegzadekandan (1g) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu dağılma fazı, sulu SDS çözeltisi (1 mg/mL) ile 1 saat boyunca 1000 rpm'de karıştırılarak makroemülsiyon oluşturulmuştur. Bunu takiben, makroemülsiyon buz soğutması altında sonikatör (Branson Sonikatör W450) ile %90 genlikte 2 dakika boyunca homojenizasyona tabi tutulmuştur (10 saniye darbe/10 saniye mola). Ardından azot ortamı altında 68 °C'de 18 saat boyunca polimerizasyon gerçekleştirilerek, filtrasyon ve son olarak yukarıda anlatıldığı şekilde nanokapsülleri saflaştırmak amacıyla ultra saf suya karşı diyalize (moleküler ağırlık kesme limiti, MWCO 6-8 kDa) tabi tutularak karakterizasyon için hazır hale getirilmiştir.

2.3. Nanokapsüllerin Karakterizasyonu

Nanokapsüllerin karakterizasyonu boyut, zeta potansiyel ölçümü ve morfolojik karakterizasyon şeklinde yürütülmüştür. Nanokapsül boyutu hidrodinamik çapın dinamik ışık saçılım (PSS Nicomp 380, Parçacık Boyutlandırma Sistemleri, ABD) metodu ile ölçümü şeklinde belirlenmiştir. Ölçümler, 20°C'de ve sabit 90° açıda yapılmıştır. Nanokapsüllerin zeta (ζ) potansiyeli, elektroforetik ışık saçılım metodu kullanılarak, Zetasizer Nano Z cihazı (Malvern Instruments, UK) ile 1 mM potasyum klorür çözeltisi (1 mL) içinde 25 °C'de belirlenmiştir. Morfolojik yapı, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelenmiştir. TEM, 120 kV hızlandırma voltajında çalışan bir JEOL 1400 transmisyon elektron mikroskobu (Jeol Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler, seyreltilmiş nanokapsül dispersiyonlarının 300 mesh karbon kaplı bakır gridlerin üzerine damlatılması ve kurumadan kaynaklı artefaktları azaltmak için fazla suyun bir filtre kağıdı kullanılarak alınmasıyla hazırlanmıştır.

2.4. Sürfaktan Değişim Yöntemi ile PEGilasyon İşlemi

Bu işlem formülasyon parametrelerinden PMMA miktarı ve molekül ağırlığı, sürfaktan miktarı ile üretim yönteminin boyut, zeta potansiyel ve morfoloji üzerine olan etkisinin sonuç ve tartışma bölümünde detaylı değerlendirilmesi ile optimum olarak belirlenen PNK1 nanokapsülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla PNK1 nanokapsülü (2 mL) içerisine farklı

miktarlarda (4 mg, 8 mg, 12 mg) iyonik olmayan sürfaktanlardan alkilpolietilen glikol eter yapısındaki Lutensol AT50 (BASF, MW: 2460 g/mol) eklenerek, oluşan karışım 3 saat boyunca 300 rpm hızında karıştırılmıştır. Nanokapsül yüzeyi ile etkileşim içerisinde olması beklenen Lutensol AT50 sürfaktanlarının iyonik yapıdaki SDS sürfaktanı ile yer değiştirmesini sağlamak amaçlı ilerletilen bu metodolojinin devamında SDS'in ortamdan uzaklaştırılması için 1 kDa moleküler ağırlık ayırma sınırına sahip rejener selülozdan oluşan membran ile 24 saat boyunca ultra saf suya karşı diyaliz gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte belli zaman aralıklarında (17 sa., 21 sa., 24 sa.) diyaliz membranından numune alınarak, ilgili numunelerin zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Her ölçüm sonrası numune diyaliz membranına geri koyularak, zeta potansiyel değerleri sabit olana kadar diyaliz işlemi devam ettirilmiştir. Son numunenin boyut ölçümü yukarıda anlatıldığı şekilde dinamik ışık saçılım (PSS Nicomp 380, ABD) metodu ile belirlenerek, işlem öncesi ve sonrası boyut değerleri karşılaştırılmıştır.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın ilk adımında PMMA nanopartikülleri miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (MÇBY) kullanılarak farklı formülasyonlarda üretilmiştir. Bu işlem için kısaca su içinde yağ (y/s) tipi bir emülsiyon oluşturulmuş ve yağ damlacıklarının su içerisindeki stabilizasyonu için iyonik bir sürfaktan olan SDS kullanılmıştır. Bu işlemde, yağ fazı olarak biyoyumlu yapıyı destekleyecek şekilde bitkisel yağlardan pirinç kepeği yağı kullanılmış olup, daha önce nanoteranostik olarak hücre içi sıcaklık ölçümünde kullanılan MÇB üretim yöntemi dikkate alınarak ilerlenmiştir [15]. Yağ fazı, Tablo 1'de görüldüğü üzere farklı formülasyonlarda değişen PMMA polimer miktarlarının organik bir çözücüde (kloroform) çözülmüş şekli ile karıştırılmış ve emülsiyonun iç fazını oluşturmuştur. Su fazı ve dağılma fazı karıştırılarak elde edilen makroemülsiyon ultrasonikasyona tabi tutularak nanodamlacık oluşumu, bir diğer değişle miniemülsiyon eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen miniemülsiyondan organik çözücünün (kloroform) yavaş bir şekilde buharlaştırılması ile PMMA polimerlerinin pirinç kepeği nanodamlacıkları üzerine kaplayarak kapsül morfolojisine ulaşması hedeflenmiştir. Burada çözücünün buharlaşma hızının da morfolojide etkili bir faktör olduğu bilinmekle birlikte, bu adım önceki çalışmalardan elde edilen bilgiler [2, 15] ile 16 saatlik bir buharlaştırma süresi olarak sabit tutulmuştur.

Tablo 1, MÇBY ile sekiz farklı formülasyon ile üretilen PMMA nanopartiküllerinin ortalama boyut ve zeta potansiyel değerlerini göstermektedir. Çalışmanın ön denemelerinde, TWEEN 80 gibi iyonik olmayan ve

farmasötik uygulamalarda sıklıkla kullanılan yüzey aktif maddeler de stabilizatör olarak kullanılmış olmakla birlikte, nanopartiküller bu şekilde başarı ile üretilmemiş ve boyutları 700 nm ile 1 mikron arasında değişen çeşitli agregat yapılar oluşmuştur. Bu nedenle çalışma iyonik bir yüzey aktif madde ile devam ettirilmiş olup, formülasyon içeriğindeki malzemelerin miktarları değiştirilerek ilerlenmiştir. İlk aşamada, PMMA miktarının (Tablo 1, PNK1, PNK2, PNK3) artırılması ve bunun ortalama boyut üzerine etkisi değerlendirilmiş olup, miktarın 150 mg değerinden 300 mg değerine çıkarılması boyutun yaklaşık 40 nm kadar büyümesine neden olmuştur. Bu artış önemli bir değişim gibi görünmese de, Şekil 2 a, b ve c'de görülen Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analizlerinde, PMMA miktarı artışının partiküllerin morfolojisini nanokapsülden nanoküre durumuna dönüştürdüğü görülmüştür. Bunun nedeni artan PMMA miktarının üretim sırasında çözücü buharlaştırma adımıyla sadece yağ damlacığı ve su ara fazında çökme şeklinde değil, tüm damlacığı kapsayacak şekilde çökmesi olduğu düşünülmektedir. Şekil 2c'de yer yer kapsül morfolojileri görülmekle beraber, morfoloji büyük ölçüde nanoküre formuna geçmiştir. Bu nedenle PMMA miktarının en düşük olduğu 150 mg (PNK1) seçilerek, ikinci adımda sürfaktan miktarının değişiminin etkisi incelenmiştir. Buradaki amaç SDS miktarının olabildiğince az kullanılması ile partikül büyüklüğü ve partikül şekli değişiminin test edilmesidir. Tablo 1'de görüldüğü üzere SDS miktarı 2.5 kat artırıldığında boyutta 30 nm kadar bir artış gözlenmekle beraber, zeta potansiyel değeri beklenildiği üzere -51 mV değerinden -72 mV değerine çıkmıştır. Her iki değer de DLVO teorisi dikkate alındığında itme kuvvetlerinin, çekme kuvvetlerinden daha yüksek olduğunun ve nanodamlacıkların birbirleri ile birleşmeyerek su içerisinde stabil olarak dağılacığının göstergesidir [24]. Bir diğer deyişle, nanopartiküller her iki durumda da stabil olup, Şekil 2e'de artan SDS miktarının (PNK4) morfolojiyi nanokapsülden uzaklaştırdığı görülmektedir. Nanokapsül morfolojisini elde etmede, emülsiyon içerisindeki fazların arayüzey gerilimlerinden kaynaklı olarak polimer nanopartiküller ile yağ damlacıklarının iki ayrı faz olarak ayrılabilmesi ve sonunda kapsül değil, heterojen bir nanoküre morfolojisine ulaşabileceği önceki çalışmalarda görülmüştür [23]. Diğer yandan nanopartiküllerin yüzeyleri çok yüksek negatif veya pozitif yükler taşıdığına, kan içerisindeki biyomoleküller ile etkileşimi sonucu agregasyon gibi olumsuz sonuçların oluşabileceği çalışmalar da mevcuttur [25]. Tüm bunlar düşünüldüğünde SDS miktarının artışı uygun olarak değerlendirilmemiş, miktarın 1 mg/mL değerinden (PNK1, Tablo 1, Şekil 2a,d) 0.35 mg/mL değerine (PNK5, Tablo 1, Şekil 2f) düşürülerek boyut, zeta potansiyel ve morfoloji üzerine etkisi değerlendirilmiştir. SDS miktarının yarıdan daha

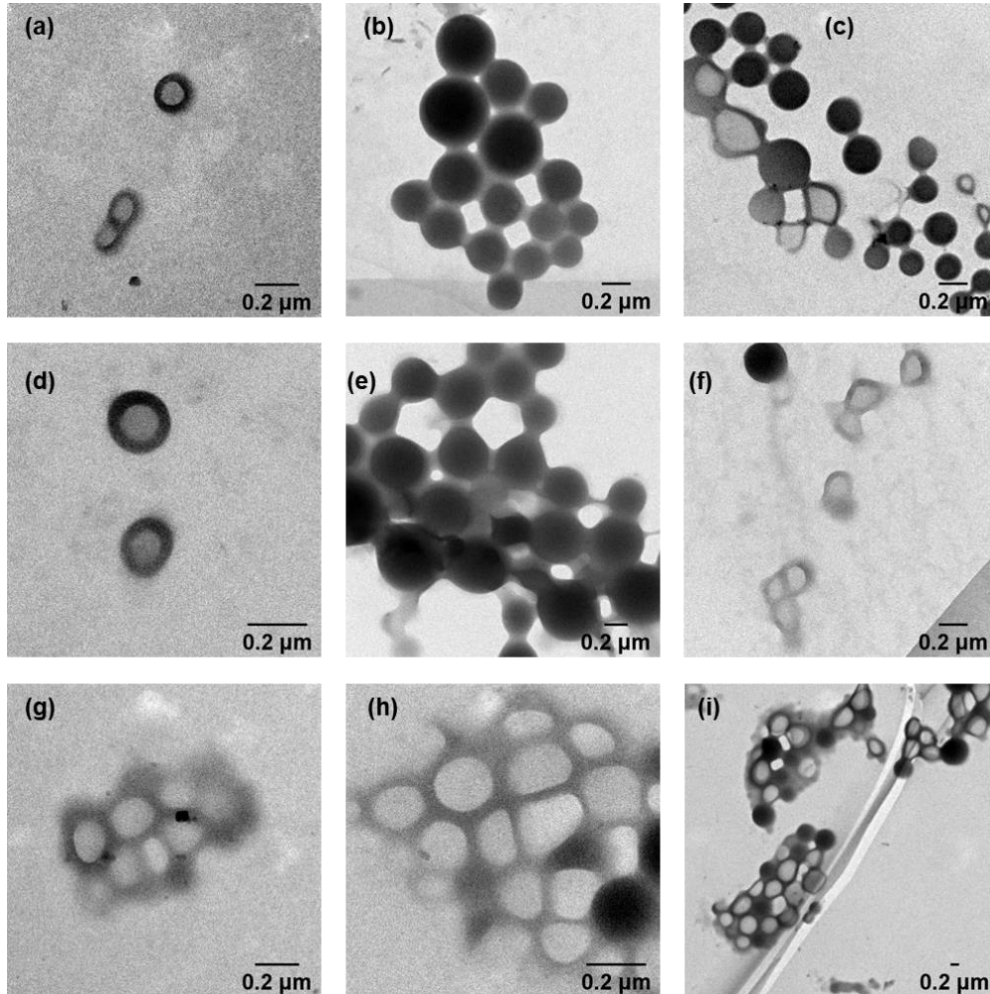
fazla azaltılması sonucu nanokapsül morfolojisi büyük ölçüde korunmakla beraber (Şekil 2f), boyut 220 nm civarından 340 nm'ye yükselmiştir. Diğer yandan zeta potansiyel değerinde önemli sayılabilecek bir azalış görülmemiş, nanopartiküller (Tablo 1, PNK4, -50.9

mV) stabilitesini sürdürmüştür. Gelinen noktada, optimum SDS miktarı 1 mg/mL olarak belirlenmiş olup, çalışmalara bu şekilde devam edilmesine karar verilmiştir.

Tablo 1. Nanokapsül Kabuk (PMMA: Polimetil Metakrilat) Miktarı ve Molekül Ağırlığı ile Sürfaktan Miktarı (SDS: sodyum dodesil sülfat) Değişimin İncelenmesi

Nanokapsül Kodu	Kabuk: PMMA Miktarı (mg)	Kabuk: PMMA Molekül Ağırlığı (kDa)	Sürfaktan: SDS Miktarı (mg/mL)	Ortalama Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)
PNK1	150	120	1	222±0.4	-51.4±1.1
PNK2	200	120	1	257±1.6	-57.7±0.9
PNK3	300	120	1	266±0.5	-59.3±1.5
PNK4	150	120	2.5	252±0.6	-72.2±0.6
PNK5	150	120	0.35	340±9.2	-50.9±0.7
PNK6	150	35	1	181±1.7	-58.9±1.4
PNK7	150	94.6	1	201±3.4	-55.9±0.8
PNK8	150	350	1	264±0.6	-69.6±1.2

*Çekirdek malzemesi olarak pirinç kepeği yağı 300 mg olarak sabit miktarda kullanılmıştır. Üretim, Miniemülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi (MÇBY) ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Morfolojik Karakterizasyon. Transmisyon Elektron Mikroskobu Sonuçları (a) PNK1, (b) PNK2, (c) PNK3, (d) PNK1, (e) PNK4, (f) PNK5, (g) PNK6, (h) PNK7, (i) PNK8.

Çalışmanın devamında, 150 mg PMMA miktarı ve 1 mg/mL SDS miktarı ile devam edilerek, farklı molekül ağırlığında PMMA polimerinin nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel ve morfolojisi üzerine etkisi incelenmiştir. Tablo 1’de listelenen nanopartikül formülasyonlarına bakıldığında 4 farklı molekül ağırlığında (35 kDa, 94.6 kDa, 120 kDa, 350 kDa) PMMA’in formülasyonda denenmesi ile boyut ve zeta potansiyel değerlerinin farklılaştığı görülmektedir. Buradaki eğilim, beklendiği üzere PMMA polimerinin molekül ağırlığı arttıkça nanopartiküllerin ortalama boyutunun da arttığı yönündedir. 35 kDa PMMA kullanıldığında boyut 181 nm iken (PNK6, Tablo 1) 350 kDa PMMA kullanıldığında boyut 264 nm olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyel değerlerine baktığımızda, yine DLVO teorisi dikkate alındığında, nanodamlacıklar arasında sürfaktanların oluşturduğu itme kuvvetinin çekme kuvvetlerinden daha yüksek olduğu ve yüksek zeta potansiyel değerlerinin (>-30 mV) tüm nanopartiküllerde görüldüğü, dolayısıyla koloidal stabilitenin sağlandığı sonucuna varılmıştır [24]. Ancak PNK4 nanopartikülünde bahsedildiği üzere, çok yüksek zeta potansiyel değerlerinin kan içerisindeki biyomoleküller ile etkileşim sırasında istenmeyen stabilite problemlerine de neden olabileceği not edilmelidir [25]. Şekil 2 incelendiğinde PNK1, PNK6 ve PNK7 nanopartiküllerinin kapsül morfolojisini koruduğu ancak molekül ağırlığı 350 kDa olan PMMA ile üretilen PNK8 nanopartiküllerin hem nanokapsül hem de nanoküre morfolojisi olmak üzere heterojen bir yapıda sonuçlandığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak, yüksek molekül ağırlığının daha önce yüksek miktarda kullanılan PMMA nanopartikül üretiminde belirttiğimize benzer şekilde (PNK3, Tablo 1) üretim sırasında çözücü buharlaştırma adımı PMMA polimerinin yer yer tüm damlacığı kaplayacak şekilde çökmesi olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan, burada hedef boyutun 200 nm civarlarında tutularak, ilerleyen çalışmalarda artırılmış geçirgenlik ve tutulum (EPR: Enhanced Permeability and Retention) etkisinden yararlanmak üzere kanserde pasif hedeflendirme uygulamalarında kullanıma potansiyelini saklı tutmaktır [26]. Sonuç olarak, çalışmanın bu adımı PMMA miktarı, molekül ağırlığı ve sürfaktan miktarı olmak üzere üç farklı parametrenin değişimi incelenmiştir. Bu grup içerisinden PNK1 formülasyonu 200 nm civarına yakın ortalama boyutu, yüksek zeta potansiyeli ile sağladığı koloidal stabilitesi ve morfolojik analizlerinde görülen net, homojen kapsül görüntüleri ile uygun bulunmuş olup, çalışmanın devamında farklı parametreler bunu baz alarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın bir sonraki adımı üretim yönteminin etkisi incelenmiştir. Tablo 1 ve Şekil 2’de görülmekte olan 8 farklı formülasyon ile MÇBY ile üretilen PMMA nanopartiküllerinin MEP ile üretimi değerlendirilmiştir. Burada, MMA monomerinin

radikal polimerizasyonu miniemülsiyon içerisinde gerçekleştirilerek, oluşan PMMA polimerinin yağ/su arafazında çökmesi ve kapsül oluşumunun sağlanması hedeflenmiştir. Bu tip üretimler sırasında Y/S emülsiyon sistemlerinde monomer damlacıkları içerisine Ostwald olgunlaşması (Ostwald ripening) etkisini ortadan kaldırmak için, yüksek hidrofobik özellikte bir yardımcı molekül eklendiği bilinmektedir. Bu amaçla genellikle hegzadekan kullanılmakta olup, literatürde bu şekilde üretilen PMMA nanokapsüller vardır [7, 8]. Ancak ürünün farmasötik olarak kullanılabilmesi için kapsül içerisinde biyoyumlu bir yağ olması hedeflendiğinden, çalışmada yine benzer şekilde öncelikle pirinç kepeği yağı kullanılmasına karar verilmiştir. Tablo 2’de görüldüğü üzere sürfaktan miktarı MÇBY yöntemi ile aynı tutulmuş olup, saflaştırılan MMA monomeri, radikal polimerizasyon işlemleri için gerekli olan başlatıcı molekül (AIBN) ve pirinç kepeği yağı ile karıştırılarak iç fazı oluşturmuştur. Ardından sulu sürfaktan fazı ile karıştırılarak makroemülsiyon oluşturulmuş ve bunu takiben ultrasonikasyon ile su içerisindeki nanodamlacıkların oluşumu sağlanmıştır. Polimerizasyonun 18 saat boyunca 68 °C’de azot ortamında gerçekleştirilmesi ile nanopartiküller elde edilmiştir. Bu işlemde başlatıcı ile reaksiyona girmeyen monomeri ortamdan uzaklaştırmak için, nanopartiküller saflaştırma adımı tabi tutulmuştur. Sonuçta, Tablo 2’de görüldüğü üzere PNK9 nanopartikülleri başarı ile üretilmemiş ve 1.3 mikron boyutundan daha büyük agregatlar oluşmuştur. Bunun nedenini anlayabilmek için, yukarıda bahsedildiği üzere pirinç kepeği yağına ilave olarak hidrofobik özelliği çok yüksek olan hegzadekan, çekirdek içeriğine eklenmiş ve polimerizasyon aynı koşullarda yürütülmüştür. Bunun sonucunda partikül boyutu 202 nm civarlarına düşmüş ve -59.2 mV zeta potansiyel değeri ile koloidal açıdan stabil bir nanopartikül elde edilmiştir. Buradan çıkan sonuç, yukarıda bahsedildiği üzere pirinç kepeği yağının tek başına polimerizasyon sırasında Laplace basıncını dengeleyemediği ve sonuçta Ostwald olgunlaşması ile küçük damlacıkların büyük damlacıklara difüze olarak agregat oluşumuna neden olduğu yönündedir. Hegzadekan ilavesinin, damlacıklar içerisindeki basınca sunduğu katkı ile Laplace basıncını dengeleyebildiği ve bu bahsedilen Ostwald olgunlaşması durumunun gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sonuç değerli olmakla birlikte, hegzadekan içeren bir yapının gelecek biyomedikal uygulamalar için fayda sağlamayacağını dikkate aldığımızda, miniemülsiyon polimerizasyonunun bu aşamada pratik olmadığı görülmüştür. Bu açıdan çalışmada daha önce başarı ile elde ettiğimiz bitkisel yağ çekirdekli (pirinç kepeği yağı) PMMA nanokapsülleri dikkate aldığımızda, miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin uygun üretim yöntemi olduğu görülmüştür.

Tablo 2. Nanokapsül Üretim Yöntemi Değişiminin İncelenmesi. Üretim Metodu: Miniemülsiyon Polimerizasyon (MEP). MMA: Metil Metakrilat. Başlatıcı: AIBN

Nanokapsül Kodu	Monomer: MMA	Çekirdek İçeriği ve Miktarı (g/mL)	Sümfaktan: SDS Miktarı	Ortalama Boyut (nm)	Zeta Potansiyel
PNK9	0.067	Pirinç Kepeği Yağı – 0.13	1	Agregat oluşumu, >1.3	-
PNK10	0.067	Pirinç Kepeği Yağı – 0.67 Hekzadekan – 0.066	1	202±0.4	-59.2±0.8

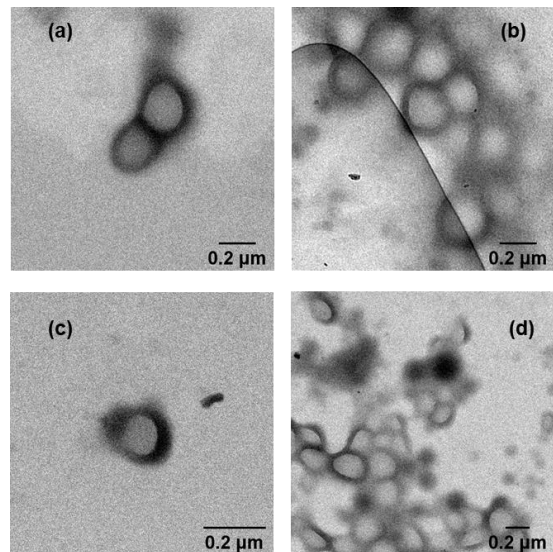
-Agregat yapılar oluştuğu için zeta potansiyel değeri belirlenmemiştir.

Şekil 1’de görülmekte olan formülasyon, üretim ve morfolojik yapının iyileştirilmesi adımlarının ardından son olarak yüzey özelliklerinin bir biyomedikal uygulama gözüyle iyileştirilmesi ve biyolojik etkileri dikkate alarak geliştirilmesi üzerine odaklanılmıştır. Bunun için, yukarıda tartışılan nedenlerden ötürü PNK1 nanokapsülleri seçilmiş olup, 222±0.4 nm boyutunda, -51.4±1.1 mV zeta potansiyel değerindeki (Tablo 3) yapının yüzey özelliklerinin geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Bilindiği üzere nanopartiküllerin kan akışındaki dolaşım süresini artırmak için yüzeyin PEG gibi çeşitli malzemelerle kaplanması ve bu sayede kandaki opsonin proteinlerle etkileşiminin azaltılması bir yol olarak önerilmektedir. Bu adım sayesinde, nanopartiküller makrofajlardan saklanabilecek ve hızlıca vücuttan atılımı engellenmiş olacaktır [27]. Diğer yandan, nanopartiküllerin yüzey yükünün azaltılması ve sterik stabilizasyonun sağlanmasının da kandaki opsonin proteinler ile etkileşimi azaltmada rolü olabileceği bilinmektedir [25, 27]. Bu iki faktör göz önünde bulundurulduğunda, klasik kovalent bağlama yöntemleri ile uygulanan PEGilasyon işleminin alternatif son derece pratik ve yenilikçi bir yaklaşımla PNK1 nanokapsüllerinin yüzeyindeki SDS sümfaktanı iyonik olmayan ve PEG yapıları bir sümfaktan olan Lutensol AT50 ile yer değiştirerek hem yüzey yükü kontrol altına alınacak, hem de yüzeyin PEGilasyonu ile opsonin proteinlerle etkileşiminin azaltılması sağlanacaktır. Bunun için 2 mg/mL, 4 mg/mL ve 6 mg/mL olmak üzere farklı miktarlarda molekül ağırlığı 2460 g/mol olan Lutensol AT50 (Tablo 3, Şekil 3) PNK1 nanopartikülüne eklenerek 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bunu takiben, 1 kDa moleküler ağırlık ayırma sınırına sahip rejenere selülozdan oluşan membran ile 24 saat boyunca ultra saf suya karşı diyaliz gerçekleştirilmiştir. Burada amaç, nanopartikül yüzeyi ile etkileşim içerisinde olan Lutensol AT50 sümfaktanının SDS ile yer değiştirerek, serbest kalan SDS moleküllerinin (molekül ağırlığı: 288.4 g/mol) diyaliz ile ortamdan uzaklaştırılmasıdır. SDS moleküllerinin ve Lutensol AT50 sümfaktanın molekül ağırlığı düşünüldüğünde, kullanılan 1 kDa diyaliz membranı bu amaca hizmet edecektir. Benzer bir yöntem daha önce silika nanokapsüllerin üretilmesi sırasında kullanılan CTMA-Cl (cetyltrimethylammonium chloride) sümfaktanının Lutensol AT50 ile yer değiştirmesi sürecinde kullanılmış ve başarı ile PEGilasyon sağlanmıştır [28]. Tablo 3 incelendiğinde, kullanılan Lutensol AT50 miktarının boyut üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı

görülmüştür. Diğer yandan, zeta potansiyelin -51.4 mV değerinden, 2 mg/mL, 4 mg/mL ve 6 mg/mL Lutensol AT50 kullanıldığında sırasıyla -29.1 mV, -20.0 mV ve -20.5 mV değerlerine düştüğü görülmüştür. Buradan çıkacak sonuç, 4 mg/mL değerinin bir limit olduğu ve Lutensol miktarının artırımının PEGilasyon açısından bir fark yaratmadığı şeklinde yorumlanabilir. Diğer yandan, zeta potansiyel değerinin -20 mV dolaylarına düşmesi, kandaki opsonin proteinleri ile etkileşim açısından olumlu bir perspektif sunmakla beraber, koloidal stabilitenin hem elektrostatik hem de sterik etkileşimlerle sağlandığını da göstermektedir. Bu, PMMA nanokapsüllerin yüzeyinin Lutensol AT50 ile kaplandığı, dolayısıyla PEGilasyon sürecinin başarı ile sonuçlandığını göstermekle beraber, yüzeyde SDS moleküllerinin de kısmen yer aldığını ve elektrostatik stabilizasyonu sağladığını göstermektedir.

Tablo 3. Optimum Nanokapsül Formülasyonunun (PNK1) Sümfaktan Değişim Yöntemi ile PEGilasyon Sürecinin İncelenmesi

Nanokapsül Kodu	Lutensol AT50 (mg/mL)	Ortalama Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)
PNK1	0	222±0.4	-51.4±1.1
PNK1-P1	2	217±1.2	-29.1±0.7
PNK1-P2	4	215±1.3	-20.0±0.7
PNK1-P3	6	216±3.4	-20.5±0.8

**Şekil 3.** Morfolojik Karakterizasyon. Transmisyon Elektron Mikroskobu Sonuçları (a) PNK1-P1, (b) PNK1-P2, (c) PNK1-P3, (d) PNK1-P3

Şekil 3'te görülmekte olan TEM fotoğrafları incelendiğinde, sürfaktan değişim sürecinin PMMA nanokapsüllerin morfolojik yapısına etkisinin olmadığı, ve tüm koşullarda kapsül morfolojisinin korunduğu görülmektedir.

IV. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışma sağlık uygulamalarında geniş bir kullanım alanına sahip PMMA nanokapsüllerin boyut, morfoloji ve zeta potansiyelini çeşitli formülasyon değişkenlerine bağlı olarak incelemiştir. Elde edilen bulgular, formülasyon bileşenlerinin ve üretim sürecinin, nanokapsüllerin incelenen özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma kapsamında, bitkisel bir yağ olan pirinç kepeği yağı içerikli nanokapsül formülasyonunun üretimi için miniemülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin uygun olduğu, miniemülsiyon polimerizasyon sürecinde ancak agregatlar elde edilebildiği sonucuna varılmıştır. Diğer yandan, PMMA miktarı ve molekül ağırlığı ile sürfaktan miktarı ve çeşidi gibi çeşitli parametrelerin de kapsül morfolojisinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca, nanopartiküllerin kan akışında yeterli süre kalabilmesi için yüzeylerinin PEG ile modifiye edilmesi için uygulanan sürfaktan değişim yöntemi, çalışmanın yenilikçi ve pratik yaklaşımlarından biri olarak öne çıkmıştır. Bu bulgular, PMMA nanokapsüllerin daha etkili sağlık uygulamaları geliştirilmesine yönelik formülasyon ve üretim süreçlerinin iyileştirilmesi için önemli bir temel teşkil etmektedir. Sonuçta, bu çalışmanın ortaya koyduğu temel bulgular, nanokapsül tabanlı ilaç salım sistemlerinin optimizasyonu ve etkinliğinin artırılmasına yönelik gelecek çalışmalara katkı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Finansal destek için Max Planck Topluluğu tarafından desteklenen Max Planck Partner Grup Fonu aracılığıyla Max Planck Polimer Enstitüsü'ne ve destekleri için Prof. Dr. Katharina Landfester'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- [1] Iyisan, B., Landfester, K. (2019). Polymeric nanocarriers. In Gehr, P., Zellner, R. (Eds.), *Biological Responses to Nanoscale Particles. Nanoscience and Technology*, Springer Nature Switzerland, (pp.53-84).
- [2] Iyisan, B., Landfester, K. (2019). Modular approach for the design of smart polymeric nanocapsules. *Macromolecular Rapid Communications*, 40 (1), 1800577.
- [3] Musyanovych, A., Landfester, K. (2014). Polymer micro- and nanocapsules as biological carriers with multifunctional properties. *Macromolecular Bioscience*, 14 (4), 458-477.
- [4] Landfester, K., Mailänder, V. (2013). Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(5), 593-609.
- [5] Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101-124.
- [6] Poon, W., Kingston, B.R., Ouyang, B., Ngo, W., Chan, W.C.W. (2020). A framework for designing delivery systems. *Nature Nanotechnology*, 15, 819-829.
- [7] Antonietti, M., Landfester, K. (2002). Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science*, 27, 689.
- [8] Landfester, K. (2009). Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 4488.
- [9] del Mercato, L. L., Ferraro, M. M., Baldassarre, F., Mancarella, S., Greco, V., Rinaldi, R., Leporatti, S. (2014). Biological applications of LbL multilayer capsules: from drug delivery to sensing. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207, 139.
- [10] Parakhonskiy, B.V., Yashchenok, A.M., Konrad, M., Skirtach, A.G. (2014). Colloidal micro- and nano-particles as templates for multilayer capsules. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207, 253.
- [11] Richardson, J., Chui, J., Björnmalm, M., Braunger, J. A., Ejima, H., Caruso, F. (2016). Innovation in layer-by-layer assembly. *Chemical Reviews*, 116, 14828.
- [12] Gaitzsch, J., Huang, X., Voit, B. (2016). Engineering functional polymer capsules toward smart nanoreactors. *Chemical Reviews*, 116, 1053.
- [13] Iyisan, B., Kluge, J., Formanek, P., Voit, B., Appelhans, D. (2016). Multifunctional and dual-responsive polymersomes as robust nanocontainers: design, formation by sequential post-conjugations, and pH-controlled drug release. *Chemistry of Materials*, 28(5), 1513-1525.
- [14] Yassin, M. A., Appelhans, D., Wiedemuth, R., Formanek, P., Boye, S., Lederer, A., Voit, B. (2015). Overcoming concealment effects of targeting moieties in the PEG corona: controlled permeable polymersomes decorated with folate-antennae for selective targeting of tumor cells. *Small*, 11(13), 1580-1591.
- [15] Iyisan, B., Thiramanas, R., Nazarova, N., Avlasevich, Y., Mailänder, V., Balushev, S., Landfester, K. (2020). Temperature sensing in cells using polymeric upconversion nanocapsules. *Biomacromolecules*, 21, (11), 4469-4478.

- [16] Bettencourt, A., Almeida, A. J. (2012). Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. *Journal of Microencapsulation*, 29, 353–367.
- [17] Kreuter, J. (2000). Poly(Methyl Methacrylate) nanoparticles as vaccine adjuvants. In: O'Hagan, D.T. (Eds.) *Vaccine Adjuvants. Methods in Molecular Medicine™* (pp.105-119). Springer, Totowa, NJ.
- [18] Zarrati, S., Mahdavi, M., Tabatabaie, F. (2016). Immune responses in DNA vaccine formulated with PMMA following immunization and after challenge with *Leishmania majör*. *Journal of Parasit Diseases*, 40, 427–435.
- [19] Alves-Betista, F., Cunha Fontele, S.B., Beserra Santos, L.K., Alves-Filgueiras, L., Quaresma Nascimento, S., de Castro e Sousa, J.M., Ramos Gonçalves, J.C., Nogueira Mendes, A. (2020). Synthesis, characterization of α -terpineol loaded PMMA nanoparticles as proposed of therapy for melanoma. *Materials Today Communications*, 22, 100762.
- [20] Sadguru Prasad, L.T., Madhusudhan, B., Kodihalli B, P. and Ghosh, P.C. (2017). Development and *in vitro* evaluation of oxytetracycline-loaded PMMA nanoparticles for oral delivery against anaplasmosis. *IET Nanobiotechnology*, 11, 119-126.
- [21] Juneja, R., Roy, I. (2014). Surface modified PMMA nanoparticles with tunable drug release and cellular uptake, *RSC Advances*, 4, 44472.
- [22] Paiphansiri, U., Tangboriboonrat, P., Landfester, K. (2006). Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets, *Macromolecular Bioscience*, 6, 33.
- [23] Agmo Hernández, V. (2023). An overview of surface forces and the DLVO theory, *ChemTexts*, 9, 10.
- [24] Tiarks, F., Landfester, K., Antonietti, M. (2001). Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization. *Langmuir*, 17, 908-918.
- [25] Roser, M., Fischer, D., Kissel, T. (1998). Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on *in vitro* phagocytosis and biodistribution in rats, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46 (3), 255-263.
- [26] Ikeda-Imafuku, M., Li-Wen Wang, L., Rodrigues, D., Shaha, S., Zongmin, Z., Mitragotri, S. (2022). Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation, *Journal of Controlled Release* 345, 512–536.
- [27] Owens, D.E., Peppas, N.A., (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307, 93–102.
- [28] Jiang, S., Mottola, M., Han, S., Thiramanas, R., Graf, R., Lieberwirth, I., Mailänder, V., Crespy, D., Landfester, K. (2020). Versatile preparation of silica nanocapsules for biomedical applications, *Particle and particle systems characterization*, 37, 1900484.