

İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN-SODYUM ALJİNAT BİYOPOLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE NAR KABUKLARINDAN  
EKSTRAKTE EDİLEN ANTİOKSİDANLARIN ENKAPSÜLASYONU**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Aylin KAZOLUK**

**Nanobilim ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı**

**HAZİRAN 2019**

**IZMIR KATIP CELEBI UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**PREPARATION OF CHITOSAN-SODIUM ALGINATE BIOPOLYMERIC  
NANOPARTICLES AND ENCAPSULATION OF ANTIOXIDANTS  
EXTRACTED FROM POMEGRANATE PEELS**

**M.Sc. THESIS**

**Aylin KAZOLUK  
(Y160220003)**

**Department of Nanoscience & Nanotechnology**

**Thesis Advisor: Asst. Prof. Dr. Ahmet AYKAÇ**

**JUNE 2019**

**İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİTOSAN-SODYUM ALJİNAT BİYOPOLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE NAR KABUKLARINDAN  
EKSTRAKTE EDİLEN ANTIOKSİDANLARIN ENKAPSÜLASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Aylin KAZOLUK**  
**(Y160220003)**

**Nanobilim Ve Nanoteknoloji Ana Bilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AYKAÇ**

**HAZİRAN 2019**

**Aylin KAZOLUK** tarafından hazırlanan “**KİTOSAN-SODYUM ALJİNAT BİYOPOLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE NAR KABUKLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN ANTİOKSİDANLARIN ENKAPSÜLASYONU**” adlı tez çalışması 27/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Nanobilim ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı :**

**Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AYKAÇ** .....  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**

**Doç. Fethullah GÜNEŞ** .....  
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Mustafa EROL** .....  
Dokuz Eylül Üniversitesi

**Date of Submission : 30.05.2019**

**Date of Defense : 27.06.2019**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmam süresince her aşamada yanımda olan, bana güvenen ve beni destekleyen danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AYKAÇ'a, sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmamda karakterizasyon çalışmalarının yapılmasında bana yardımcı olan ve imkan sağlayan, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Ofisi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans yapma kararında ve tezimi hazırlama sürecinde yanımda olan ve bana güvenmekten vazgeçmeyen aileme şükranlarımı sunarım. Bu çalışma aileme adanmıştır.

HAZİRAN 2019

AYLİN KAZOLUK

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>3</b>
2.1 Nar .....	3
2.2 Antioksidanlar .....	4
2.3 Ekstraksiyon.....	9
2.4 İlaç Taşıma Sistemleri ve Nutrasötikler.....	9
2.5 Enkapsülasyon Teknolojisi .....	10
2.6 Biyopolimerler.....	11
2.6.1 Kitosan.....	12
2.6.2 Sodyum aljinat.....	14
2.6.3 Yapılan benzer çalışmalar .....	16
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1 Materyal.....	19
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Nar kabuğundan antioksidan madde ekstraksiyonu.....	19
3.2.2 Fenolik madde analizleri.....	23
3.2.2.1 Toplam fenolik miktarı tayini.....	23
3.2.2.2 Toplam flavonoid tayini.....	23
3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayini.....	23
3.2.3 Kitosan-aljinat nanopartiküllerinin hazırlanması.....	24
3.2.4 Kitosan-aljinat nanopartiküllerinin karakterizasyonu.....	27
3.2.4.1 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	27
3.2.4.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	27
3.2.4.3 Ultraviyole Görünür Spektroskopisi (UV-Vis).....	27
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>28</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>34</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>40</b>

## KISALTMALAR

<b>Alg</b>	: Aljinat
<b>Cs</b>	: Kitosan
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>Nps</b>	: Nanopartiküller
<b>Cs/Alg Np</b>	: Kitosan/Aljinat nanopartikülü
<b>DPPH</b>	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>Na-Alg</b>	: Sodyum Aljinat
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
<b>pH</b>	: Hidrojen gücü (Power of Hydrogen)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>RE</b>	: Retinol
<b>R*</b>	: Lipit radikali
<b>ROO*</b>	: Peroksi radikali
<b>RO*</b>	: Alkoksi radikali
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>GST</b>	: Glutasyon-S-Transferaz
<b>BHT</b>	: Bütilenmiş Hidroksitoluen
<b>BHA</b>	: Bütilenmiş Hidroksianisol
<b>TBHQ</b>	: <i>t</i> -butilhidrokinon
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
<b>LE</b>	: Liyofilize ekstre
<b>E</b>	: Liyofilize olmayan ekstre
<b>Np</b>	: Yükleme yapılmamış nanopartikül
<b>YNp</b>	: Yükleme yapılmış nanopartikül
<b>E</b>	: Etanol
<b>E-S</b>	: Etanol-su karışımı
<b>S</b>	: Su

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> İnsanlarda antioksidan vitaminlerin ihtiyacının değişimi.....	5
<b>Tablo 2.2:</b> Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin uygulama özeti.....	18
<b>Tablo 4.1:</b> Nanopartikül örneklerinin boyut kıyaslaması.....	31





## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması.....	6
Şekil 2.2: Polifenollerin sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.3: Nar kabuğunda bulunan önemli fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları..	8
Şekil 2.4: Nanopartiküllere madde yüklenme aşaması.....	11
Şekil 2.5: Kitosanın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.6: Aljinik asitin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.7: Sodyum aljinat-kitosan bağlanması-yumurta modeli.....	16
Şekil 3.1: Yıkamış, ayıklanmış nar kabukları.....	20
Şekil 3.2: Ev tipi öğütücü.....	20
Şekil 3.3: Öğütülmüş kuru nar kabukları.....	20
Şekil 3.4: Çözgen ile maserasyon uygulanmış örnek.....	21
Şekil 3.5: Ultrasonik su banyosu.....	21
Şekil 3.6: Filtrasyon işlemi.....	22
Şekil 3.7: Evaporatörde çözgenin uçurulması.....	22
Şekil 3.8: Peristaltik pompa ile iyonik jelasyon işlemi.....	24
Şekil 3.9: Santrifüj öncesi örnekler.....	25
Şekil 3.10: Santrifüj sonrası nanopartiküller.....	25
Şekil 3.11: Kitosan-sodyum aljinat nanopartikül üretim akış şeması.....	26
Şekil 4.1: Karşılaştırmalı SEM görüntüleri.....	28
Şekil 4.2: Boş kitosan-sodyum aljinat nanopartiküllerinin FTIR spektrumları..	33
Şekil 4.3: UV-Vis Spektroskopisi sonuçları.....	34
Şekil 4.4: Antioksidan madde analizleri.....	35

# ATIK NAR KABUKLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN ANTIOKSİDAN MADDELERİN SODYUM ALJİNAT/KİTOSAN DAN ELDE EDİLEN BİYOPOLİMERİK NANOPARTİKÜLLERE ENKAPSÜLASYONU

## ÖZET

Son yıllarda, başta sanayi alanında olmak üzere tıp, kimya, gıda ve diğer alanlarda da üretimde artış gözlenmiştir. Üretim artışı yan ürünler ve atık oluşumunu beraberinde getirmektedir. Gıda alanında meyve ve sebze kabukları uzun yıllar atık olarak kullanılmıştır. Ancak düzgün bir şekilde işlendikten sonra, kullanılabilir forma getirilen kabuklar gıda takviyesi olarak değerlendirilebilir. Nar (*Punica granatum*), antioksidan özelliğinden dolayı popülerliği artan meyvelerden olup, ayrıca bu meyvenin kabukları da narın yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Yüksek antioksidan içeriğine sahip olan bu meyve; vücutta zararlı serbest radikallerin oluşumunu azaltarak, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olmaktadır. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon yöntemi ile doğaya zarar vermeden, su ve etanol çözümleri ile nar kabuklarından antioksidan ekstresi elde edilebilir. Elde edilen antioksidan maddelerinin, ışık, ısı, pH ve benzeri etkenlerden korunabilmesi için Enkapsülasyon Teknolojisi'nden yararlanılabilir. Kitosan (Cs) kabuklu deniz canlılarından elde edilen, toksik olmayan, biyouyumlu ve biyobozunabilir bir polimerdir. Aljinat (Alg) ise deniz yosunlarından elde edilen ve kitosan ile kimyasal modifikasyona girerek daha üstün nanopartiküller üretilmesine yardımcı olan doğal bir polimerdir. Bu çalışmada ilk kez, Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen antioksidanlar, Kitosan-Aljinat (Cs-Alg) nanopartikülleri içerisine enkapsüle edilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak Sodyum Aljinat (Na-Alg) ve Cs polimerleri, Kalsiyum Klorür ( $CaCl_2$ ) ile çapraz bağlanması sağlanılarak biyopolimerik nanopartiküller (NPs) elde edilmiştir. Nanopartikül üretimi sırasında santrifüj hızının ve süresinin; partikül boyutu ve yapısına olan etkisini gözlemlemek için, farklı hız ve sürelerde örnekler hazırlanmıştır. Üretilen nanopartiküllere antioksidan madde yüklemeye önce ve yükledikten sonra, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile karakterizasyonları tamamlanmıştır. Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde miktarı ve DPPH yöntemiyle de antioksidan aktivite analizleri yapılmıştır. Etanol (%100), Saf Su (%100) ve Etanol:Saf Su (%50:50) çözümleri ile nar kabuklarının Ultraviyole Görünür Spektroskopisi (UV-Vis) ölçümleri alınarak farklı çözümlerinin ekstraksiyona etkisini incelenmiştir.

# **PREPARATION OF CHITOSAN-SODIUM ALGINATE BIOPOLYMERIC NANOPARTICLES AND ENCAPSULATION OF ANTIOXIDANTS EXTRACTED FROM POMEGRANATE PEELS**

## **ABSTRACT**

In recent years, there has been an increase in production in some fields, such as medicine, chemistry, food and others, especially in industry. The increase in production also brings about by-products and wastes. In the field of food, fruit and vegetable shells have been used as waste for many years. However, after properly processed, the shells formed into usable form can be considered as food supplements. Pomegranate (*Punica granatum*) is one of the fruits whose popularity has increased due to its antioxidant properties, and also, the peels of this fruit constitute about 40% of the pomegranate. Not only this fruit has high antioxidant content, but also, by reducing the formation of harmful free radicals in the body, it helps to eliminate the negative effects of many diseases, especially cancer. Antioxidant extract can be obtained from pomegranate peels prepared in water and ethanol solvents with the help of Ultrasonic Assisted Extraction method without damaging the nature. Encapsulation Technology can be used to protect the antioxidants obtained from light, heat, pH and similar factors. Chitosan (Cs) is a non-toxic, biocompatible and biodegradable polymer obtained from shellfish. Alginate (Alg) is a natural polymer obtained from Marine Algae and helps to produce superior nanoparticles by chemical modification with chitosan. In this study, antioxidants obtained by Ultrasonic Assisted Extraction method were encapsulated into Chitosan-Alginate (Cs-Alg) nanoparticles for the first time. In this context, biopolymeric nanoparticles (NPs) were obtained by first cross-linking Sodium Alginate (Na-Alg) and Cs polymers with Calcium Chloride ( $\text{CaCl}_2$ ). During the production of nanoparticles, in order to observe its effect on particle size and structure, samples were prepared at different speeds and durations. Before and after loading antioxidant material to the nanoparticles produced, their characterizations were completed by Scanning Electron Microscope (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity analysis was performed by DPPH method. Ultraviolet Visible Spectroscopy (UV-Vis) measurements of pomegranate shells, extracted in Ethanol (100%), Pure Water (100%) and Ethanol:Pure Water (50: 50%) solvents, were investigated and the effect of different solvent ratios on extraction was investigated.

## 1. GİRİŞ

Günümüzde sağlıklı ve uzun bir yaşam için doğal besinlere yönelim artmıştır. Özellikle son zamanlarda kanser gibi birçok hastalığa karşı vücudun savunma mekanizmasını korumak adına antioksidan içerikli gıda tüketimi gündeme gelmiştir. Nar, üzüm, karadut gibi meyvelerin antioksidan değerlerinin yüksek olması sebebiyle özellikle meyve suyu endüstrisinde kullanımları mevcuttur. Ancak meyve suyu endüstrisinde bu faydalı gıdaların kabuk kısmı atık olarak kabul edilmektedir. Birçok ülkede atık değerlendirmesinin önem kazanmasıyla yapılan çalışmalarda narın kabuk kısmında bulunan antioksidan maddelerin meyve kısmında bulunan oranına kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Yoğun tempoda düzensiz ve dengesiz beslenme, sigara tüketimi ve benzeri durumların yol açtığı, insan sağlığına ciddi zararlar veren kimyasal süreçler ve özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Antioksidanlar, bu serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirir ve hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleri sayesinde hücrelerin hasar görmesini ve tümör oluşum riskini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da yavaşlatarak daha sağlıklı bir yaşam şansı verirler. Antioksidan özelliği bulunan birçok madde vardır. Bu maddelerden beslenme ile alınanlar arasında nar da bulunmaktadır. Günlük diyetle yeterli antioksidanın vücuda alınmasında nardaki antioksidan maddelerin aljinat ve kitosan ile enkapsülasyonundan yararlanılabilir [1].

Oksidasyon; insan ve hayvan hücrelerinde veya yağ içerikli gıdaların renk, tat ve kokularında oksijenin oksidatif etkisiyle oluşan ve genellikle istenmeyen değişimlerdir. Serbest radikal oluşumuna sebep olan kaynakların başında ultraviyole ışınlar, radyasyon, güneş ışınlarının bir kısmı, virüsler, sigara dumanı, stres, enfeksiyon, iltihap, yağ metabolizmasının toksik ürünleri, klor, oksijen ve zirai mücadelede kullanılan ilaç kalıntıları yer almaktadır. Oksidasyonun zararlı etkilerinden korunmak için indirgeyici maddelere yani antioksidan maddelere ihtiyaç

duyulur. Bu maddeler yokluğunda oksidatif stres meydana gelir ve eğer sürekli bir hal alırsa kanser, nörolojik hastalıklar gibi hastalıklara sebep olabilir [2].

Nar kabuğu büyük ölçüde fenolik maddeleri içermektedir. Delphinidin, siyanidin, antosiyaninleri başta olmak üzere gallik asit tipi tanenler, elajik asit ve türevleri antioksidan aktiviteye ciddi katkılar sağlayan bileşenlerdir [3]. Narın pembeden mora uzanan renk tonlarını veren maddeler de antosiyanin grubu maddelerdir. Birçok araştırma ve çalışmada nar ekstraktlarının antimikrobiyal ve antiviral etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Günlük diyetle vücuda alımı pek mümkün olmayan nar kabuğundaki değerli maddelerin gıda katkısı olarak ya da direk vücut kullanımını ancak ekstraksiyon işlemi sonucunda gerçekleştirilebilir [4]. Elde edilen ekstraktlar daha sonra fonksiyonel gıdalarda, nütrosetiklerde ve enkapsülasyon ile iletim sistemi olarak kullanılabilir.

Enkapsülasyon teknolojisi; katı, sıvı ve gaz haldeki bileşenlerin, enzimlerin ve diğer maddelerin, protein, karbonhidrat veya diğer maddeler içerikli bir kaplama materyaliyle kaplanması/hapsedilmesi şeklinde tanımlanabilir [5]. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan enkapsülasyon teknolojisi, fonksiyonel gıdalarda yer alan flavonoid gibi antioksidan maddelerin korunması, kontrollü salımı, raf ömrünün uzatılması gibi bir çok uygulamada kullanılmaktadır [6].

Kitosan, kabuklu deniz canlılarından bulunan kitinin distile edilmesi ile elde edilen doğal bir polimerdir. Biyopolimer özelliğinden dolayı sağlık açısından güvenli, toksik olmayan, biyoyumlu ve biyobozunur bir maddedir ve gıda ve ilaç endüstrisinde geniş kullanım alanlarına sahiptir. Aljinat gibi diğer biyopolimerlerle kuvvetli bağlar ile kompleks oluşturarak özellikle kapsülleme ve ilaç taşıma sistemlerinde büyük yer kaplamaktadır [7].

Aljinat toksik olmayan, biyobozunabilir ve biyoyumlu bir maddedir. Bu özellikleri ile gıda ve enkapsülasyon alanında geniş kullanım alanı bulmaktadır. Çoğunlukla jelleştirici ajan ile kullanılan aljinatın, yapılan çalışmalarla, diğer kalsiyum tuzları içerisinde  $\text{CaCl}_2$ 'nin aljinat için en etkili jelleştirici olduğunu ortaya koymuştur [8].

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Nar

Nar (*Punica granatum Linn.*), genellikle tropik iklimde yetişen ülkemizde de geniş bir üretim ve tüketim alanına sahip bir meyvedir. Olgun narların kabuk rengi, parlak kırmızı-sarıdır [9]. Olgunluk ve hasat dönemleri yaz mevsimi sonrasındır. Ülkemizdenar hasadı Ağustos sonunda başlayıp, Kasım ortalarına kadar sürmektedir. Yetişkin bir nar ağacı yılda ortalama 150 kg ürün vermektedir. Anavatanı Güneybatı Asya olan nar “Çin elması” olarak da adlandırılır [10]. Ülkemizde de çeşitliliğe sahip olan narın en çok yetiştirilen ve ihraç edilen çeşidi, *hicaznar*'dır. Bu nar çeşidi kırmızı renk kabuklara, kırmızı-viole danelere ve tatlı-mayhoş bir tada sahiptir. Bu özellikleri ile hem günlük tüketimde hem de gıda endüstrisinde tercih edilmektedir. Narın meyvesinin yenebilen kısımları, yani daneleri, meyvenin %52'sini oluşturmaktadır [9]. Nar tanelerinin 100 g'ında; %79 su, %18 karbonhidrat, %1.1 protein ve %0.9 yağ olduğu bildirilmektedir [11]. Nar, diğer meyvelerle kıyaslandığında en yüksek toplam polifenol konsantrasyonunu içeren, bilinen en eski meyvelerden biridir [12]. Narların gıda endüstrisindeki temel kullanımları arasında meyve suyu veya nar içerikli içecekler bulunur. Genellikle bir atık olarak kabul edilen bir meyve suyu yan ürünü olan nar kabuğu, meyvenin yaklaşık% 30-40'ını oluşturur. Bu yan ürün atıkları genellikle hayvan yemi olarak değerlendirilir. Son zamanlarda meyve kabukları, meyve/meyve suyu işleme endüstrisinde önemli ekonomik faydaları nedeniyle giderek cazip hale gelen yeni biyoaktif bileşik kaynakları olarak kabul edilmektedir. Meyve kabuğundaki faydalı doğal antioksidanların araştırılmasına ve gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmasına ilgi artmaktadır [13]. Kim ve arkadaşlarıyla yapılan bir çalışmada nar kabuğu zengin bir antioksidan ve fenolik madde kaynağı olarak bildirilmiştir. Şüphesiz, narın antioksidan kapasitesi, fenolik maddelerin ve özellikle elagik asitin varlığıyla ilgilidir [14]. Birçok meyve kabuğunda bulunan bu bileşikler, nar

ekstrelerinin farklı kısımlarının antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal aktiviteye neden olduğu belirlenmiştir [15]. Geçmişten günümüze kadar nar kabuğundan fenolik madde elde etmek için çok çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bunların başında 4 saat boyunca aseton, etil asetat, metanol ve su ile bir Soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle kurutulmuş nar kabuğundan fenolik maddeler ekstre edilmiştir. Antioksidan kapasiteleri belirlenen nar kabuğu ekstraktlarının hem antioksidan hem de antimutagenik özelliklere sahip olduğutespit edilmiştir [16]. Yine bir çalışmada, kurutulmuş toz nar kabuğundan fenolikleri metanol, kloroform ve etil asetat gibi çözümlerle ekstrakte etmiş ve bu ekstrenin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* gibi dirençli bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiğini saptamışlardır [17]. Nar kabuğundan elde edilen fenolik maddeler, Soxhlet ekstaksiyonu, normal karıştırma, mikrodalga-destekli ekstraksiyon ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu gibi çeşitli ekstraksiyon metotlarıyla ekstrakte edilebilir [18]. Nar kabuklarının, narın çekirdek ve nar pulp ekstraktları ile kıyaslandığında antioksidan aktivitesinin diğerlerine kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, Çin'de yaygın tüketilen 28 meyvenin kabuk, pulp ve çekirdek içeriklerinde antioksidan aktiviteyi incelemişler ve nar kabuklarının en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra yaptıkları bir çalışmada ise, nar kabuklarından antioksidan bileşikleri etanol, metanol ve aseton çözümleri ile ekstrakte etmişlerdir. Bu çalışma sonunda kabuklardaki antioksidan aktivitenin pulp ekstraktının antioksidan aktivitesine kıyasla daha yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [19].

## 2.2 Antioksidanlar

Antioksidanlar, gıdaları ve bu gıdaları tüketen canlıları oksijen gibi serbest radikal moleküllerin oksidatif zararlarına karşı koruyan ve bu moleküllerin olumsuz etkilerini önemli ölçüde azaltan bileşiklerdir. Antioksidanların en önemli kaynağı bitkisel gıdalar olduğundan diyetle aldığımız antioksidanlar fitokimyasal antioksidanlar olarak da adlandırılırlar. Antioksidanlar, canlılardaki serbest radikallerle reaksiyona girerek radikalleri nötralize edip hücrelerin onlardan etkilenmesini engelleyen veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek tümör gelişimini önlerler [20].

İnsanlarda antioksidan vitaminlerinin ihtiyacının yaş ve cinsiyete göre değişimi Tablo 2.1’de gösterilmiştir;

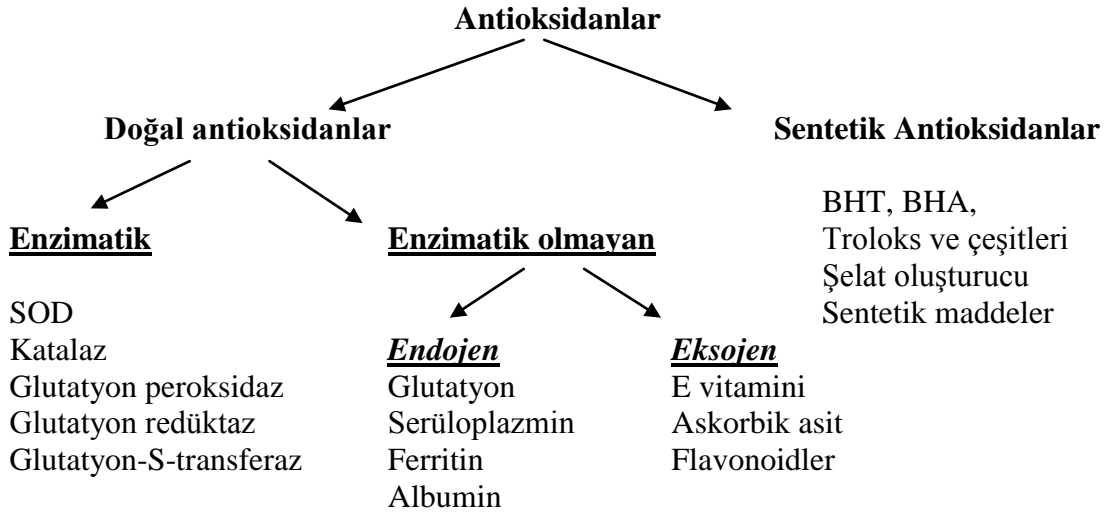
**Tablo 2.1:** İnsanlarda antioksidan vitaminlerin ihtiyacının değişimi [21].

(RE)\* Retinol, 1 retinol = 1 µg vitamin A şeklinde belirlenmiştir.

Antioksidanlar	Erkek			Kadın		
	20-39 yaş	40-59 yaş	≥60 yaş	20-39 yaş	40-59 yaş	≥60 yaş
<b>Vitamin A (RE)*</b>	878 ± 40.6	1115 ± 80.2	1117 ± 61.5	961 ± 74.4	945 ± 52.8	997 ± 58.5
<b>Vitamin C (mg)</b>	102 ± 4.5	107 ± 6.0	110 ± 7.5	85 ± 5.9	91 ± 5.3	99 ± 3.8
<b>Vitamin E (mg)</b>	10.4 ± 0.47	10.4 ± 0.44	9.2 ± 0.45	8.2 ± 0.32	9.1 ± 0.41	7.6 ± 0.24

Antioksidanlar, oksidatif zincir reaksiyonlarının (chain-breaking) başlamasını (initiation) veya gelişmesini (propagation) önleyerek, lipidlerin veya diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen bileşiklerdir. Antioksidanlar, 2 başlıkla incelenebilir; oksidatif zincir reaksiyonlarının “başlamasını önleyen primer antioksidanlar” ve “gelişimini önleyen ikincil veya koruyucu (preventive) antioksidanlar”. Bu reaksiyonlar sonunda, antioksidanlar, lipid radikali (R\*) ile reaksiyona girerek lipid oksidasyonunun başlamasını önleyebilir ya da peroksi (ROO\*) veya alkoksi (RO\*) radikalleri ile reaksiyona girerek oksidasyonunun gelişimini önleyebilirler. İkincil antioksidanlar ise, lipidlerin oksidasyonunu geciktirirler [22]. Oksijen kullanan canlılarda; lipid, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerin oksidasyonunu önleyen enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan bileşikler bulunur. Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatiyon peroksidaz (GPx), Glutatiyon Redüktaz (GR), Glutatiyon-S-Transferaz (GST) önemli antioksidan enzimlerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; Askorbik asit, E vitamini, karotenoidler, fenolikler başta olmak üzere, indirgenmiş glutatiyon, albumin, seruloplazmin ve ferritinden oluşur. Askorbik asit, E vitamini ile provitamin A aktivitesi gösteren β-karoten, oksijenin reaktif formlarını, fenolik maddeler ise, serbest radikalleri bağlayarak, metallerle şelat oluşturur ve lipoksigenaz enzimini etkisiz hale getirerek antioksidan etki gösterir [19]. Antioksidanların sınıflandırılması Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

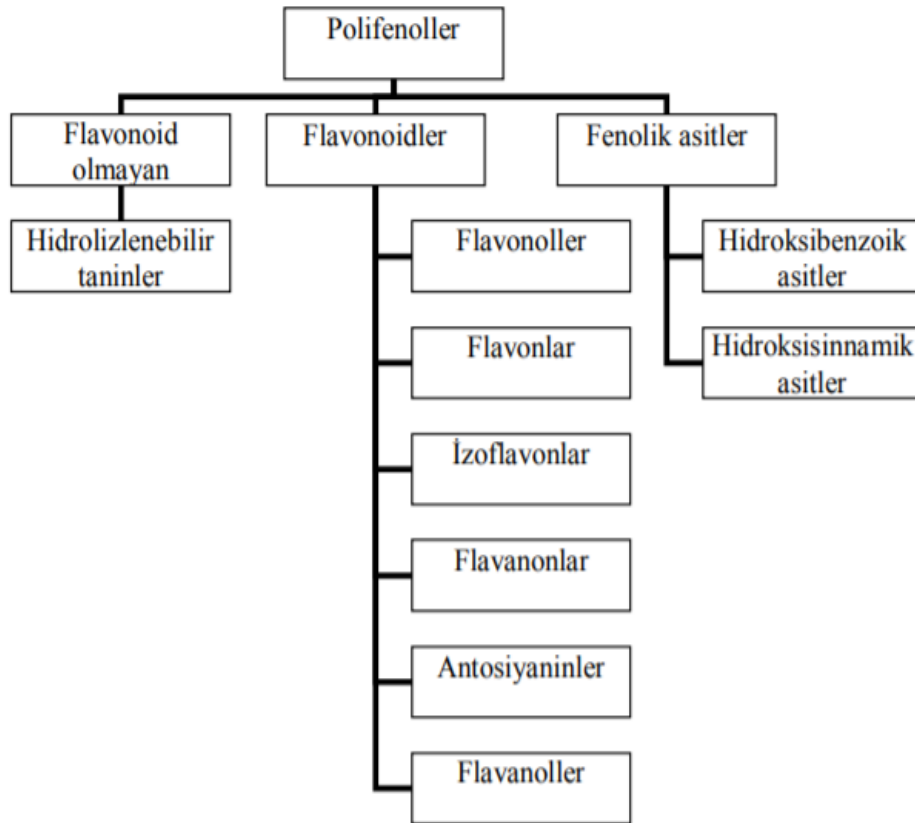




**Şekil 2.1:** Antioksidanların sınıflandırılması.

Serbest radikal oluşumuna neden olan kaynakların başında UV ışınlar, radyasyon, güneş ışınlarının bir kısmı, enfeksiyon, sigara dumanı, virüsler, stres, iltihap, yağ metabolizmasının toksik ürünleri, tarım ilacı kalıntıları yer almaktadır. Serbest radikaller bütün hücresel moleküller ile reaksiyona girebilirler ve hücresel hasar oluşumu ile yağlardaki peroksidasyon ve DNA hasarları meydana gelir. DNA hasarı ile serbest oksijen radikallerinin, mitokondrial ve nükleer DNA'daki timinle reaksiyona girmesiyle, tek zincir kırılmaları oluşur ve bu şekilde hücrelerin enerji kaybetmesiyle hücre ölümü gerçekleşir. Bugüne kadar oksidatif olarak değişime uğrayan yaklaşık 20 tür DNA tespit edilmiştir [23]. Canlılar sahip oldukları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri sayesinde serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmaktadırlar. Aksi takdirde reaktif oksijenler hücrelerin ölümüne sebep olurlar. Gıdalarda lipit oksidasyonu gerçekleştiğinde, istenmeyen kimyasal reaksiyonlar sonucu sağlığa zararlı bileşikler oluşur. Bu sebeple, bu riski en aza indirmek ve lipit oksidasyonunun neden olduğu bozulmaları geciktirmek adına, bazı sentetik antioksidanlar (bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), *t*-bütillhidrokinon (TBHQ) ve propil gallat) gibi eklenir. Ancak, bu antioksidanlar potansiyel sağlık riskine sahiptir ve birçok ülkede kullanımı sınırlandırılmış hatta yasaklanmıştır. Bu nedenle, sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanlara ilgi artmaktadır [24].

Fenolik bileşikler, bir aromatik halkaya bağlı bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren maddelerdir. Fenolikler en aktif doğal antioksidanlardan olup, serbest radikalleri bağlayarak, metallere şelatları oluşturarak ve lipoksijenaz enzimini inhibe ederek antioksidan etki göstermektedirler. Polifenollerin sınıflandırılması Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerden olan polifenoller, lipid ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) bağlarını kıran radikalleri (ROO-) bağlarla bağlanarak süpürebilen antioksidanlardır [25].

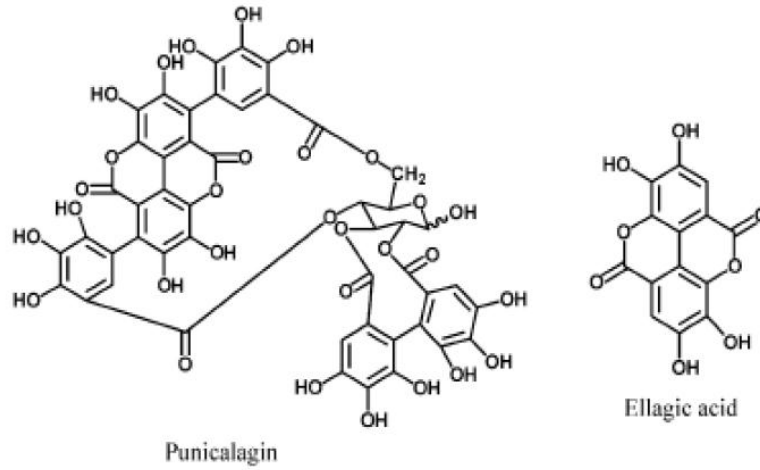


**Şekil 2.2:** Polifenollerin sınıflandırılması.

Fenolik maddelerin emilimlerinde şelat oluşumu, molekül boyutu, midede kalma süresi, gıdanın karışımı (yağ, protein, karbohidrat), parçalama ve pişirme işlemi, çözünürlüğü, ilk geçiş etkisi, bağırsak membranlarının geçirgenliği ve karaciğerdeki biyotransformasyon gibi faktörler tarafından değişebileceği bildirilmiştir. Bitkisel kaynaklı gıdalardan birçoğu, en güçlü antioksidan olan fenolik maddeleri içermekle birlikte oksidatif zararlara karşı vücudun savunmasına da katkıda bulunmaktadır. Bu maddeler gıdaları bozulmalara karşı korurken tüketilmeleri durumunda da vücudumuza antioksidan madde sağlamaktadırlar. Bitkisel kaynaklı fenolik

maddeler; fenolik asitler, stilbenler, lignanlar ve flavonoidler gibi alt gruplara ayrılırlar ancak bunlar içerisinde antioksidan olarak önem taşıyanlar, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Antioksidan özelliklerinden dolayı flavonoidler, beslenmedeki en önemli antikansorejenlerden biridir [26].

Nar, yüksek oranda fenolik madde içermektedir. Bu fenoliklerin önemli bir bölümü de narın kabuğunda bulunur. Yüksek molekül ağırlığına sahip fenolik bileşikler; kondense olabilen (proantosiyandinler) ve hidrolize olabilen fenolikler (ellajitanenler ve gallotanenler) olarak 2 gruba ayrılmaktadırlar [27]. Nar kabukları hidrolize olabilen fenolikler açısından son derece zengin olup, başta ellajitanen ve izomerleri olmak üzere, gallik asit, ellajik asit ve glikozitlerini (pentoside, hexoside vb.) içermekte olup bunlardan yaygın bulunanların kimyasal yapıları Şekil 2.3'de belirtilmiştir.



**Şekil 2.3:** Nar kabuğunda bulunan önemli fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları [27].

Nar kabukları polifenoller ve aktif bileşenler bakımından zengin bir kaynak olmasının yanı sıra antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile de gıdalarda koruyucu madde olarak ve gıda filmlerinin aktif paketlenme özelliklerinin iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır [28].

### **2.3. Ekstraksiyon**

Özütleme olarak da bilinen ekstarksiyon işlemi istenilen aktif bileşenlerin ayrılması ve seçici çözücülerle işleme tabi tutularak istenmeyen ve çözünmeyen maddelerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Birçok ekstraksiyon yöntemi mevcuttur. Ancak günümüzde sanayi açısından daha düşük maliyetli, yüksek verimli, sürdürülebilir, sağlık açısından ise toksik kalıntı kalmadan vücuda zararsız maddeler kullanılarak yapılan ekstarksiyon yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır [29].

#### **Ekstraksiyon yöntemleri**

- Soxhlet Ekstraksiyonu
- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
- Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
- Ultrason Destekli Ekstraksiyon
- Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu
- Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon [29].

Ultrason destekli ekstraksiyon klasik ekstraksiyon yöntemlerinden farklı olarak fiziksel ve kimyasal olaylar içermektedir. Bu sayede daha az işlem süresi, daha yüksek kalite ve azaltılmış kimyasal madde kullanımı ve verim artışı ile çevre dostu avantajlar sunmaktadır. Ultrason ile ekstrakte edilen ürünlerde ekstrakte edilebilir bileşiklerin salınmasını kolaylaştırmakta ve hücre duvarını parçalayarak kütle taşınmasını arttırmaktadır. Çalışma süresinin kısaltılmasının yanı sıra az miktarda çözücü kullanıldığından çevreye zararsız, temiz ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Aromatik maddeler, pigment, antioksidan ve diğer organik ve mineral bileşikler güvenli ve verimli şekilde ekstrakte edilebilmektedir [30]. Bunların başında da ve ultrason ile ekstraksiyon gelmektedir. Ultrason destekli ekstraksiyon ile, bitki (polifenoller, antosiyaninler, aromatik bileşikler, polisakaritler ve fonksiyonel bileşikler) veya hayvandan (kitin, lutein) bitki ve yağların, proteinlerin ve biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu sağlanabilmektedir [31].

### **2.4. İlaç Taşıma Sistemleri Ve Nutrasötikler**

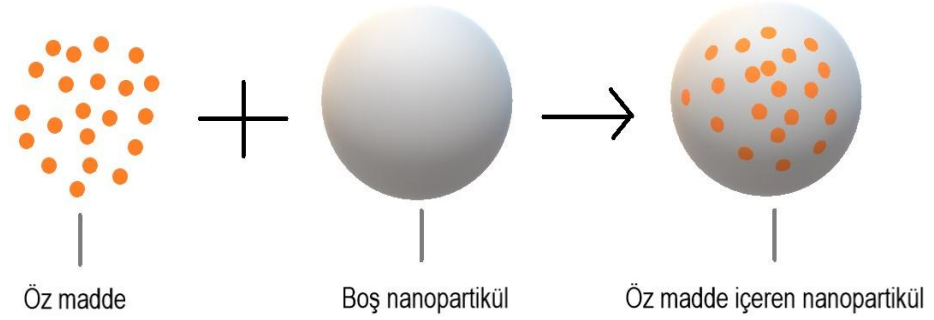
İlaç taşıma sistemleri, bir ilacın veya doğal bileşiğin belirli bir hastalıklı bölgeye minimum toksikolojik etki ile yüksek verimle iletilmesi ve etki etmesi için

kullanılmaktadır. Bu sistemler libozomlar, mikro-nano küreler, ön ilaçlar ve diğer birçok maddeden oluşmaktadır. Nanoteknolojinin bu alanda çeşitli tıbbi uygulamalarda polimerlerin nanometre ölçeğinde üretilmesinde büyük katkısı bulunmaktadır. İlaç taşıma sistemlerinde biyopolimerlerin kullanımı, sentetik polimerlere kıyasla biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük toksisite sağlamaktadır. Bu sayede iletilmesi istenen maddelerin, az çözünürlüğe bağlı ortaya çıkan düşük biyoyararlanım, zayıf bağırsak emilimi, hedef bölgeye eksik dağıtım, fizyolojik yan etkiler ve plazma tutarsızlığı gibi sorunların ortadan kaldırılması mümkün olmaktadır [32].

## **2.5. Enkapsülasyon Teknolojisi**

Enkapsülasyon işlemi; katı, sıvı veya gaz haldeki gıda maddelerinin, enzimlerin, mikroorganizmaların, protein veya karbonhidrat temelli bir kaplama malzemesiyle paketlenmesi şeklinde tanımlanabilir. Bu sebeple enkapsülasyon gıda endüstrisi dışında, kimya, ziraat, tıp, eczacılık, biyoteknoloji gibi birçok alanda uygulanabilmektedir. Mikroenkapsülasyon, yükleme yapılacak maddenin uygun malzemelerle kaplanması ve küçük bir küre şeklinde eşit yüzey dağılımına sahip duvarlama ve yükleme yapılmış maddenin belirli zaman aralığında sabit bir miktarda düzenli salınımı işlemidir [33].

Nano enkapsülasyon, 1-1000 nm arasında değişen çaplardaki madde yüklü parçacıkların oluşumunu içerir. Yüklenecek madde nanopartikülün yüzeyine absorbe edilebilir veya partikül içerisine kapsüllenebilir. Nanopartiküller, mikron büyüklüğünde partiküllerle karşılaştırıldığında, daha büyük bir yüzey alanına sahip olmasıyla, gelişmiş biyoyararlanımı, gelişmiş kontrollü salınım avantajları sağlar. Fenolik madde kapsüllenmesinde daha çok nano-enkapsülasyon teknolojisinden yararlanılır [34]. Şekil 2.4'de enkapsülasyon işleminde nanopartiküllere madde yükleme aşaması gösterilmiştir.



**Şekil 2.4:** Nanopartiküllere madde yüklenme aşaması.

Enkapsülasyon yöntemleri kapsüle edilecek madde ve nanopartikülün üretildiği polimerlere göre değişiklik gösterir. Biyopolimerlerle üretilen nanopartiküller için yaygın kullanılan üretim ve enkapsülasyon yöntemi iyonik jelasyondur. Bu yöntem ile boş küreler elde edilir ve küre içerisine madde yüklemesi sağlanır. Genellikle fenolik madde gibi doğal bileşiklerin kapsüle edilmesinde biyopolimerlerden yararlanır. Mide ve bağırsak ortamının pH düzeylerinden ürünün etkilenmemesi için genellikle kitosan-aljinat biyopolimerleri birlikte kullanılabilir [35].

## 2.6. Biyopolimerler

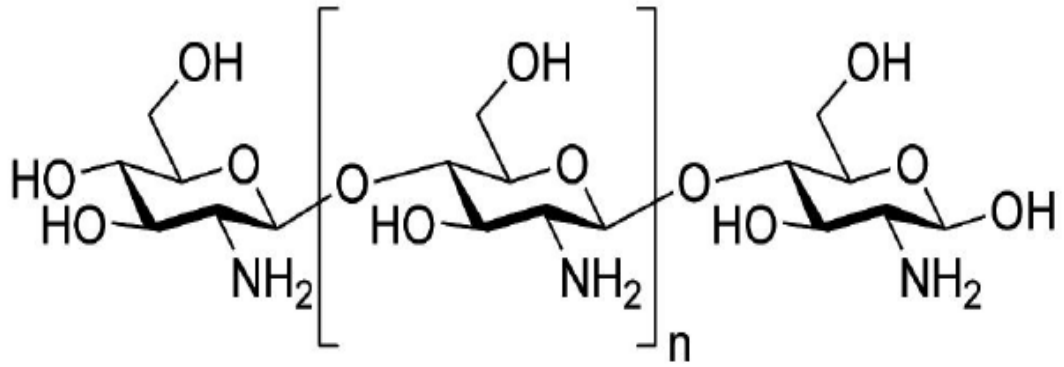
Polimerler, çok sayıda aynı veya farklı atomların kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturduğu uzun zincirler olarak tanımlanabilir. Polimerler çok sayıda tekrarlanan monomer denilen küçük birimlerden oluşur. Eğer polimer zinciri üzerindeki atomları aynı türdenseniz bu polimerlere homozincir, farklı ise heterozincir polimer denilir. Biyopolimerler, doğadaki bitkiler ve hayvanlardan elde edilen polimerlerdir. Son zamanlarda biyopolimerik nanopartiküller, kapsülleme ve nutrasötiklerin kontrollü bir şekilde verilmesi için fonksiyonel gıdalar alanında büyük ilgi görmüştür. Genel olarak biyopolimerik nanoparçacıklar proteinlerden, polisakkaritlerden veya bunların türevlerinden sentezlenir. Biyopolimer nanoparçacıkların genellikle biyobozunurluk, biyoyumluluk ve düşük toksisiteye sahip olması gibi özellikleri özellikle gıda uygulanabilir hale getirir. Biyopolimer nanoparçacıkları, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından farmasötik ve gıda nano taşıyıcıları olarak onaylanmıştır. Biyopolimerler yenilenebilir, doğal olarak bol

miktarda bulunur ve gıda endüstrisinde düşük maliyetli bileşenler olarak kullanılabilir. Ayrıca, biyopolimerler jelasyon, emülsifikasyon ve su tutma özellikleri de dahil olmak üzere kullanışlı fonksiyonel özellikler sergiler. Yapılan araştırmalarda biyopolimerlerin hem hidrofilik hem de hidrofobik olan ilaçları hapsedebildiği ve vücutta biyoyumluluk probleminin yaşanmadığı görülmüş ve bu özellikleri sayesinde biyopolimerlerin sentetik polimerlere karşı önde olduğunu göstermiştir. İlaç salım sistemlerinde biyopolimerlerin kullanımı son yıllarda hızla artmıştır [36]. Günümüzde, kitosan ve aljinat gibi doğal biyopolimerler tarafından hazırlanan polimerik nanopartiküller, biyolojik bozunabilirliği, biyoyumluluk ve güvenli olmaları nedeniyle ilaç dağıtım sisteminde çok çalışılan maddeler olmuştur. Aljinat, asidik koşullarda kararlıdır ancak alkali ortamlarda şişer ve yavaşça çözülmeye başlar. Bu nedenle aljinat, taşıdığı bileşiklerin, mide gibi asitli bir ortamda tutulması ve serbest bırakılmasıyla, önce mide sonra ince bağırsak gibi nötr ortamlarda kontrollü bir salım yapma potansiyeline sahiptir. Ancak bu nanopartiküller zamanla oda sıcaklığında kararsızlık gösterebilir ve bu da kapsüllenmiş maddenin nanopartikül matrislerinden kolayca sızmasına sebep olabilir. Aljinat nanopartiküllerinin kitosan ile kaplanması bu ortamlarda daha stabil kalmasına yardımcı olur. Pek çok çalışmada yüklenen maddenin mide ve bağırsak ortamından geçerken bozulmaması için bu biyopolimerlerden yararlanılmıştır. Biyopolimerik nanoparçacıklar, küçük boyutlarından kaynaklanan benzersiz özellikleri ve davranışları nedeniyle son birkaç yılda önemli ilgi görmüştür. Bu nanopartiküller, teşhis ve ilaç dağıtımını gibi geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Biyopolimerik nanopartiküllerin taşıyıcı olarak avantajları arasında kontrollü salınım, yüklemde kombinasyonu yapma yeteneği, hem terapi hem de görüntüleme, ilaç moleküllerinin korunması ve spesifik hedeflemesi bulunur [37].

### **2.6.1. Kitosan**

Kitosan, karides, yengeç ve istakoz gibi kabuklu deniz canlılarından elde edilen doğal biyopolimer olan kitinin kısmi N-deasetilasyonu ile hazırlanan doğal bir polimerdir. Kitosan bazı mikroorganizmalarda, maya ve mantarlarda da bulunur. Kitin çoğu çözücüde çözünmese de, kitosan, asetik asit, formik asit gibi organik asitlerle hazırlanan çözeltilerde çözünür. Kitosan (1-4) bağlı 2-amino-2-deoksi-b-D-

glükopiranozdan oluşan doğrusal bir polisakarittir. Selülozdan sonra, kitin doğada en yaygın bulunan polisakkarittir. Biyolojik olarak güvenli, nontoksik, biyoyumlu ve biyobozunur maddedir. Kitosanın yapısı 1950’de çözülmüştür ve 1970 yıllarında ilaç dağıtım sistemlerinde geliştirilmiştir. Şekil 2.5’de kitosanın kimyasal yapısı gösterilmiştir. Kitosan sadece sulu asidik ortamlarda çözünür ancak mide ve bağırsak pH’sından etkilenmez. Bu sebeple bu ortamlarda ilaç taşımak için kitosan çok yaygın kullanılmaktadır [38].



Şekil 2.5: Kitosanın kimyasal yapısı.

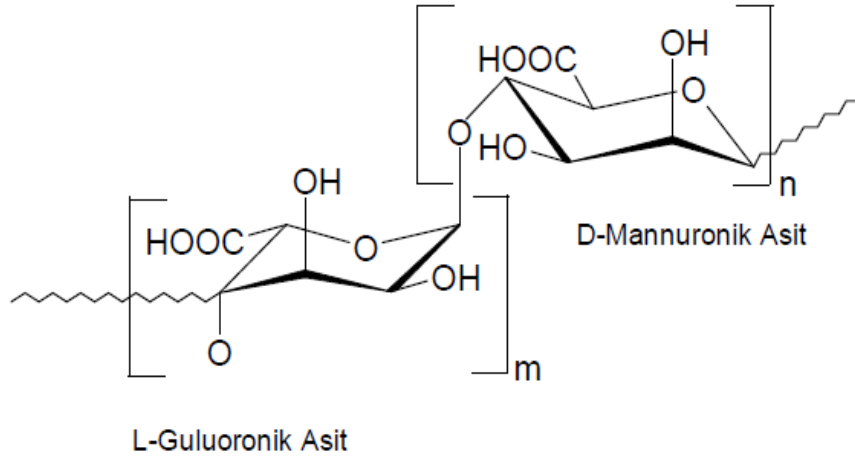
Yara iyileştirme, antimikrobiyal aktiviteler gibi önemli biyolojik özellikler gösterir. İnsan vücudunda ciltte tahrişe sebep vermeden kullanılabilir. Mükemmel bir film olarak, mikro/nanopartiküller, mikroküreler mikrokapsülleri ve jeller halinde işlenebilir. Ayrıca, yapısındaki serbest amino grupları sayesinde kimyasal modifikasyonlara uygundur. 1993 yılında Gallo tarafından beyine ilaç iletimi çalışmalarında kitosan kullanılmıştır. Kitosan muko-yapışkan ve emilim artırıcı özellikler ile hücreler arasındaki sıkı bağlantıyı açarak çalışılan ilacın mukoza hücrelerini geçebilmesini sağlar [39]. Ayrıca kitosanın ışınlama yöntemi ile de gıda endüstrisinde katkı ve koruyucu amaçlı kullanımı için araştırmalar yapılmaktadır. Kitosanın antioksidan aktivitesi, C<sub>2</sub> pozisyonundaki amonyum (NH<sup>3+</sup>) iyonunun, H<sup>+</sup> iyonu vererek serbest radikalleri dengelemesinden gelmektedir. Kitosan, portakal, elma, patates cipsi, fermente kurutulmuş sosis, sığır etive meyve sularının korunmasında antioksidan katkı maddesi olarak kullanılmıştır [40]. Biyobozunur oluşu ile kitosan nanopartiküllerinden film üretimi ile de gıdaların dış ambalajı ile



korunması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda gıda ile etkileşime girmeden gıda muhafazasında kitosandan yararlanılabileceği belirtilmiştir [41]. Yakın zamanda nişasta, jelatin, selüloz, kitosan, sodyum aljinat ve bunların türevleri gibi birçok polisakarit gıda ambalajlarının uygulanması için araştırılmıştır. Diğer polisakaritlere kıyasla kitosan, gazlara seçici geçirgenlik ( $\text{CO}_2$  ve  $\text{O}_2$ ), iyi antibakteriyel aktivite, mükemmel film oluşturma yetenekleri gibi belirgin avantajları nedeniyle film malzemeleri olarak seçilmiştir. Bununla birlikte, zayıf su buharı bariyer performansı ve ciddi kırılma gibi durumlar gıda ambalajlarına doğrudan uygulanmasını sınırlandırırken çapraz bağlama maddesiyle kimyasal modifikasyon ile bu dezavantajların üstesinden gelmenin mümkün olduğu görülmektedir [42].

### **2.6.2. Sodyum aljinat**

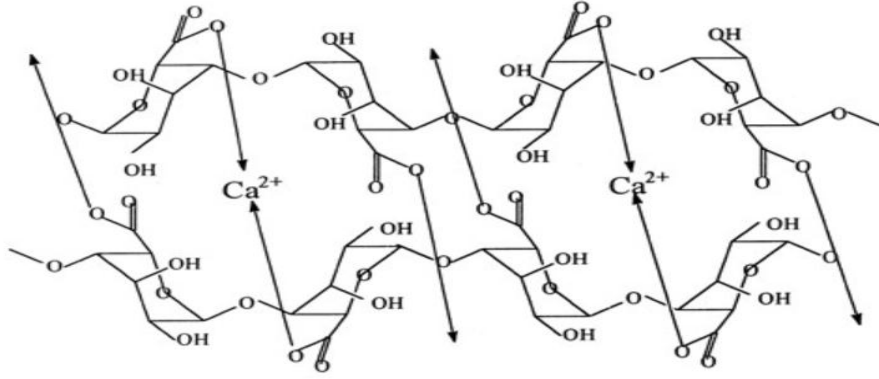
Aljinat, kahverengi deniz yosunlarının hücre duvarından elde edilen doğal bir polisakarittir [43]. Aljinik asitin (1-4) bağlı  $\beta$ -D-mannuronat ve C-5 epimeri  $\alpha$ -L-guluronat homopolimerlerin lineer bir kopolimeridir. Aljinik asitin kimyasal yapısı Şekil 2.6'da belirtilmiştir, bu asitin uygun bazlarla muamele edilmesi sonucu aljinat elde edilir. Aljinik asitin tek değerlikli katyonlarla verdiği tuzlar genellikle suda çözünürken, iki ve çok değerlikli katyonlar ile verdiği tuzlar suda çözünmeyen kararlı jel yapılar oluştururlar. Aljinat, biyopolimer ve polisakarit yapısından dolayı nontoksiktir ve bu sayede yenilebilen gıda ambalajlarında ve hatta doğrudan gıda katkısı olarak kullanılabilir. Aljinat doğal bir madde olduğundan, düşük toksisite ve yüksek biyobozunurluk gibi avantajlara sahiptir [44]. Aljinik asit inter moleküler bağları sebebiyle yüksek yoğunluklu "asit jel" oluşumunu sağlar. Oluşturduğu bu jel yapılar su tutma kapasitesi kapiller kuvvetler nedeniyle ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [43].



**Şekil 2.6:** Aljinik asitin kimyasal yapısı.

Aljinik asit ve aljinat tuzları toksik olmaması ve jel özellikleri sayesinde tıpta, sanayide ve günlük hayatta pek çok uygulama alanı bulan maddelerdir. Günlük yaşamdan en bildiğimiz örneği mide ilaçlarıdır. Midede asit artışı ve reflü gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan şuruplarbazı basit bazlar ve sodyum aljinat içermektedir. Aljinat dişçilikte diş kalıplarında ve basit dolgularında kullanılmaktadır [45]. Gıda endüstrisinde de kendine yer bulan aljinatın gıdalarda temel olarak jelleştirici ve emülsiyeciler olarak kullanılmasının yanında, viskozite sağlayıcı, jel oluşturucu gibi hem kaplamalarda hem de gıda katkıları olarak kullanılmaktadır. Aljinat gıda katkı maddeleri olarak uluslararası E kodlamasına sahiptir. Yapılan bir çalışmada sodyum alginat ile kaplanmış mercan balığında antioksidan kapasitenin arttığı, raf ömrünün uzadığı belirtilmiştir [46]. Kaplama malzemesi olarak alginat kullanımı ile ürünün duyu özelliklerinin geliştiği ve su kaybının azaltıldığı belirlenmiştir. Alginatın, taze dilimlenmiş meyve dilimlerinde meydana gelen enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını da önlediği tespit edilmiştir [47]. Aljinat jelleri kitosan, nişasta, selüloz ve dekstran gibi araştırılan birçok biyopolimer arasında, küreler, jeller, mikro ve nanokapsüller oluşturma kabiliyetine sahiptir. Bu özellik ile aljinat, "yumurta modeli" olarak adlandırılan, fonksiyonel grupları birbirine bağlayan ve çapraz bağlama maddesi olarak da işlev gören iki değerlikli katyonlarla etkileşime girebilmesinden kaynaklanmaktadır [48]. Sodyum aljinatın kalsiyum ile iyonik jelasyon yöntemi ile oluşturduğu yumurta modeli yapısı

Şekil 2.7’de belirtilmiştir. Özellikle küresel kapsüllemelerde bu sebeplerle aljinat oldukça tercih edilen bir biyopolimer olmuştur. Uygun kombinasyonlarla aljinatın nanoküre oluşumu başka biyopolimerlerle de zenginleştirilebilir.



Şekil 2.7: Sodyum aljinat-kalsiyum bağlanması-yumurta modeli.

### 2.6.3 Yapılan benzer çalışmalar

Byopolimerler üzerine birçok çalışma mevcut olup, son zamanlarda özellikle iki polimerin kompleks oluşturmasına dayanan araştırma ve yöntemler artmıştır. Nalini ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada polifenolik bir nutrasötik olan kuersetinin aljinat/kitosan nanopartiküllerine yüklemesi gerçekleştirilmiş iyonik jelyasyon yöntemi kullanılmıştır. Kuersetin yüklü ve yükleme yapılmamış aljinat/kitosan nanopartiküllerinin morfolojileri, kapsülleme yüzdeleri hesaplanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Nanopartiküllerin büyüklükleri ortalama 118-225 nm ve %82 oranında kuersetin kapsüllemesi belirlenmiştir. Bu çalışma ile üretilen aljinat/kitosan nanopartiküllerinin ilaç yükleme ve salımında sağlık açısından güvenli bir şekilde kullanılabilceği ortaya konmuştur [49]. Ahmad vd. yapılan diğer bir çalışmada ise aljinat nanopartiküllerinin kantrollü katyonla indüklenen jelleşme yöntemiyle üretimi gerçekleştirilmiş ve antitüberküloz ilaç yüklemesi yapılmıştır. Daha az doz ile daha yüksek verim elde edilmesi amaçlanarak farelere oral yoldan uygulama yapılmıştır. İlaç seviyeleri dokularda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçülmüş ve sonuçta tek bir dozla 7-11 gün boyunca plazmada antitüberküloz ilacın salındığı tespit edilmiştir. Aljinat nanoparçacıklarında %70-90 arasında değişen yüksek ilaç kapsülleme verimi elde edilmiştir [50].

Sarmiento vd. Yine kitosan/aljinat nanopartiküllerini iyonik jelasyon tekniği ile üretmişler ve içine insülin molekülünü hapsederek pH ortamındaki yapısını araştırmışlardır. Yapılan analizler sonucunda insülinin yapısının bozulmadan biyolojik etkinliğinin nanopartiküllerle korunduğu, Cs/Alg nanopartiküllerinin ilaç taşıma sistemlerinde güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir [51]. Li ve arkadaşları Cs/Alg nanopartiküllerini iyonotropik jelasyon tekniği ile üretmişler ve nifedipin salımını incelemişlerdir. Nanopartiküllerin boyutları yaklaşık olarak 20-50 nm çapında olduğu bulunmuştur. Nifedipin salımı gastrointestinal sistemde başlangıçta yüksek oranda olup sonrasında kontrollü ve başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir [52].

Birçok ekstraksiyon çalışmasında özellikle meyve kabuklarından elde edilecek maddeler için soxhalet ekstaktörü kullanılır. Ancak yüksek çözgen ihtiyacı ve seri üretimde kullanışlı olamaması gibi durumlardan dolayı alternatif yöntemler de bulunmaktadır. Tablo 2.2’de ultrason destekli ekstraksiyon ile ürünlerden farklı sıcaklık ve çözücülerle yapılan ekstraksiyon çalışmaları özetlenmiştir. Çözgen oranları ve süreler değiştirilerek en uygun yöntem bulunmaya çalışılmıştır. Kaderides ve arkadaşları, nar kabuklarından fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonu ve daha sonra sprey kurutma ile kapsüllenmesine dayanan bir yöntem geliştirilmişlerdir. Çeşitli parametrelerin ekstraksiyon verimi, kapsülleme verimi ve mikrokapsüllerin fiziksel özellikleri üzerindeki etkilerini incelemişler ve ultrason destekli ekstraksiyonun mikrokapsülasyonda verimi arttırdığını gözlemişlerdir [53]. Literatürde %50 sulu etanolla nar kabuğundan ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışması bulunmamıştır. Kitosan-sodyum aljinat biyopolimerik nanopartiküllerin karakterizasyonları sonrası nar kabuklarından %50 sulu etanolla ekstrakte edilen antioksidanların yüklenmesi çalışması ilk defa bu tez çalışmasında yapılmıştır.

**Tablo 2.2:** Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin uygulama özeti.

Ürün	Çözücü	Süre (dakika)	Sıcaklık	Ultrasonik Banyo Frekansı	Kaynak
Nar Kabuğu	Etanol,Su, Etil-asetat, % 50 sulu metanol	20-30 40-60	25 <sup>0</sup> C	20 kHz	[53]
Hindistan Cevizi Kabuğu	% 50 etanol-su	20-40 60	30 <sup>0</sup> C 45 <sup>0</sup> C 60 <sup>0</sup> C	25 kHz	[54]
Zeytin Yaprağı	%70-90 etanol	6-30	25 <sup>0</sup> C 40 <sup>0</sup> C	20 kHz	[55]
Pirinç Taneleri	Metanol/su	20	10 <sup>0</sup> C 70 <sup>0</sup> C	24 kHz	[56]
Siyah Çay	%80 Sulu metanol	30	30 <sup>0</sup> C 40 <sup>0</sup> C	26 kHz 40 kHz	[57]

Yapılan çalışmalar dikkate alınarak farklı çözümlerin ekstraksiyona etkisini belirlemek amacıyla %100 etanol, %100 su ve %50 sulu etanol olmak üzere üç farklı çözümler ile nar kabuklarından ekstraksiyon yapılmıştır. Bundan sonraki aşamalarda en az çözümler zararı ile en fazla verim elde edilen yöntem üzerinden nanopartiküllere antioksidan madde yüklemesi gerçekleştirilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Kitosan (low molecular weight) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'den, Aljinik asit sodyum tuzu (low viscosity) Alfa Aesar'dan, Kalsiyum Klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) Carlo Erba'dan, Asetik Asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , % 99 saflıkta) ve Etil alkol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , %99 saflıkta) Sigma-Aldrich, DPPH, Gallik asit, Folin reaktifi (Ege Üniversitesi) kimyasalları kullanılmıştır.

Ekstarkte edilecek narlar İzmir-Selçuk yöresinden temin edilmiştir.

Isıtıcılı karıştırıcı, otomatik pipetler, santrifüj, saf su cihazı, ultrasonlu su banyosu (Isolab), pH metre, etüv, peristaltik pompa (Shenchen lavV1), buzdolabı, hassas terazi (Radwag), evaporatör (Buchi-Rotavapor R-100), liyofilizatör (Biobase) İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'nden kullanılmıştır.

Karakterizasyon için SEM, FTIR ve UV-Vis cihazları İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'nden; antioksidan analizleri için de tüm cihaz ve kimyasallar Ege Üniversitesi'nden kullanılmıştır.

#### 3.2 Yöntem

##### 3.2.1 Nar kabuğu ekstraksiyonu

Narlar yıkanıp kurulandıktan sonra mümkün olduğunca az bıçakla temas edecek şekilde kesilerek nar taneleri ayırma aparatı ile kabuklarından ayrıldı. Kabuklar tekrar yıkanarak kurulandı (nar tanelerinin sularının kalmaması için). Temiz filtre kağıdı üzerine serilen nar kabukları İzmir'de 2018 yılı Kasım ayında oda sıcaklığında ışık almayan ortamda kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan nar kabukları, ev tipi öğütücüden geçirilerek küçük parçalar elde edildi. Çalışmalarda kullanılan tüm madde ve materyaller Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1:** Yıkanmış, ayıklanmış nar kabukları.



**Şekil 3.2:** Ev tipi öğütücü.



**Şekil 3.3:** Öğütülmüş kuru nar kabukları.

Ekstraksiyon işlemi için çözücü olarak %50 etanol:su (v/v) hazırlanmıştır. Örneklerden 10 g tartılarak 150 mL çözücü ile muamele edilmiştir. Bir gece karanlık ortamda ışık ve hava almayacak şekilde maserasyona bırakılmıştır.



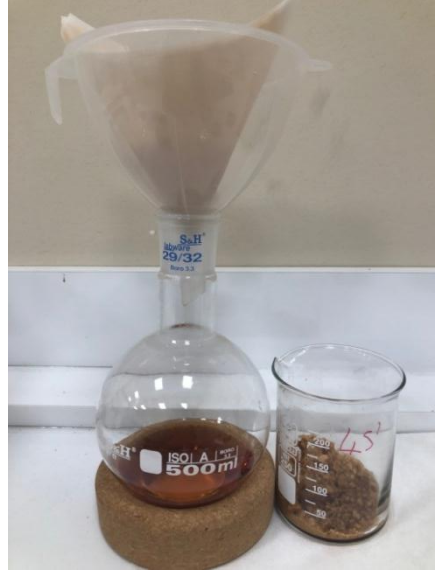
**Şekil 3.4:** Çözgen ile maserasyon uygulanmış örnek.



**Şekil 3.5:** Ultrasonik su banyosu.

Çözgen ile maserasyona bırakılan örnekler (Şekil 3.4) beherle birlikte 50 KHz enerjili ultrasonik su banyosuna (Şekil 3.5) konulmuş, 35<sup>0</sup>C’de 60 dakika tutulmuştur. İşlem sonunda tortu kalmaması için örnekler filtre kağıdından süzülerek (Şekil 3.6) evaporatör için balona aktarılmıştır.





**Şekil 3.6:** Filtrasyon işlemi.

40<sup>0</sup>C’de evaporatörde etanol-su çözgeni uçurularak geriye fenolik maddelerin kalması sağlanmıştır. Evaporatörde çözgen uçurma işlemi Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.7:** Evaporatörde çözgenin uçurulması.

### **3.2.2 Fenolik madde analizleri**

Tüm antioksidan ve fenolik madde analizlerinin doğru sonuçla çalışmaları yönlendirmesi için nar kabuğu örneklerinin ekstraksiyon sonrası liyofilize ekstre (LE) ve liyofilize olmayan ekstre (E) halleri ayrı ayrı analiz edilmiştir.

#### **3.2.2.1 Toplam fenolik miktarı tayini**

Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. 1:10 oranında seyreltilmiş 200 µl örnek çözeltisi ve 1,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (10 kat seyreltilmiş olarak) karıştırıldı. %7,5 (w/v)'lik sodyum karbonat çözeltisinden 1,2 ml eklendikten sonra tüpler vortekste karıştırıldı ve 25°C'de karanlık ortamda 90 dakika bekletildikten sonra UV-Vis spektrofotometrede 765 nm'de absorbans ölçüldü. Toplam fenol içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri olarak verildi. Deneysel üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı.

#### **3.2.2.2 Toplam flavonoid tayini**

Toplam flavonoid tayini spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Kalibrasyon standardı olarak kateşin kullanıldı. Uygun oranlarda seyreltilmiş 0,25 ml örnek çözeltisi ve 1,25 ml saf su karıştırıldı. Sırasıyla 75 µl % 5'lik NaNO<sub>2</sub>, 6 dakika sonra 150 µl % 10'luk AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ve 5 dakika sonra 0,5 ml 1 M NaOH ilave edildi. En son saf su ilave edilerek 2,5 ml'ye tamamlandı. 10 saniye vorteksten sonra spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbans okundu. Toplam flavonoid içeriği kateşin kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kateşin eşdeğeri olarak verildi. Deneysel üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı.

#### **3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayini**

Örneklerin antioksidan aktivitesi, hidrojen bağlama kabiliyeti DPPH metoduyla (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikalini yakalama) ölçüldü. Uygun oranda seyreltilmiş örneklerden 100 µl alındı ve üzerine 2 ml 0,1 mM DPPH metanol solüsyonu ilave edildikten sonra vortekste karıştırılıp oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika bekletildi. Reaksiyon sonucunda oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 517 nm'de ölçüldü.

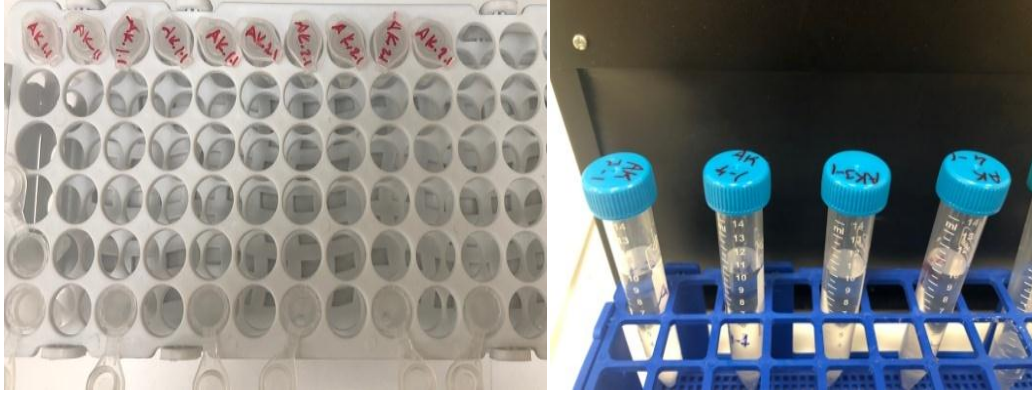
### 3.2.3 Kitosan-sodyum aljinat nanopartiküllerin hazırlanması

Kitosan ve sodyum aljinat biyopolimerlerinin nanopartikül üretiminde iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Kalsiyum Klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ile çapraz bağlanarak nanopartiküllerin üretimi yapılmıştır. Kitosan-aljinat nanopartikülleri Sarmiento vd. (2007b)'e ve Gün (2013, yüksek lisans tezi)'ne göre hazırlandı. Öncelikle 0,074 g sodyum aljinat tartılarak 117,5 mL distile suda 0,05 g  $\text{CaCl}_2$  25,0 mL suda ve 0,022 g kitosan 25 mL % 1'lik asetik asit çözeltisinde çözüldü. Karışır durumdaki sodyum aljinat (0,63 mg/mL) çözeltisine 7,5 mL kalsiyum klorür çözeltisi (2,0 mg/mL) peristaltik pompa (Şekil 3.8) yardımıyla saniyede bir damla olacak şekilde damlatıldı.



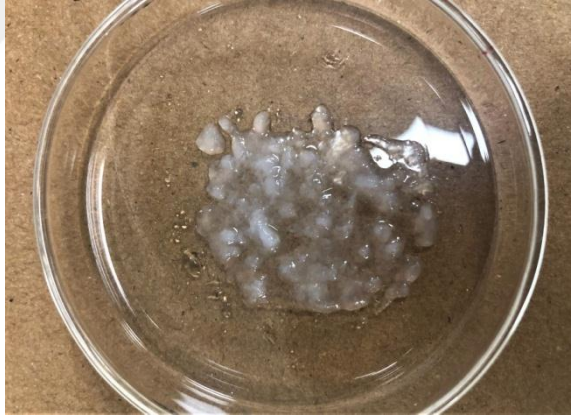
Şekil 3.8: Peristaltik pompa ile iyonik jelasyon işlemi.

Çözelti 30 dakika karıştırılıp üzerine 25 mL kitosan çözeltisi yine saniyede bir damla olarak eklendi. Oluşan karışım oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde bir gece karışmaya bırakıldı. Ertesi gün çözelti santrifüj tüplerine konularak 2800 rpm ve 14000 rpm'lik devirlerde 40 ve 60 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ve nanopartiküllerin ayrımı tüplerde iken gözlemlendi. Santrifüj öncesi örneklerin hazırlık aşaması Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



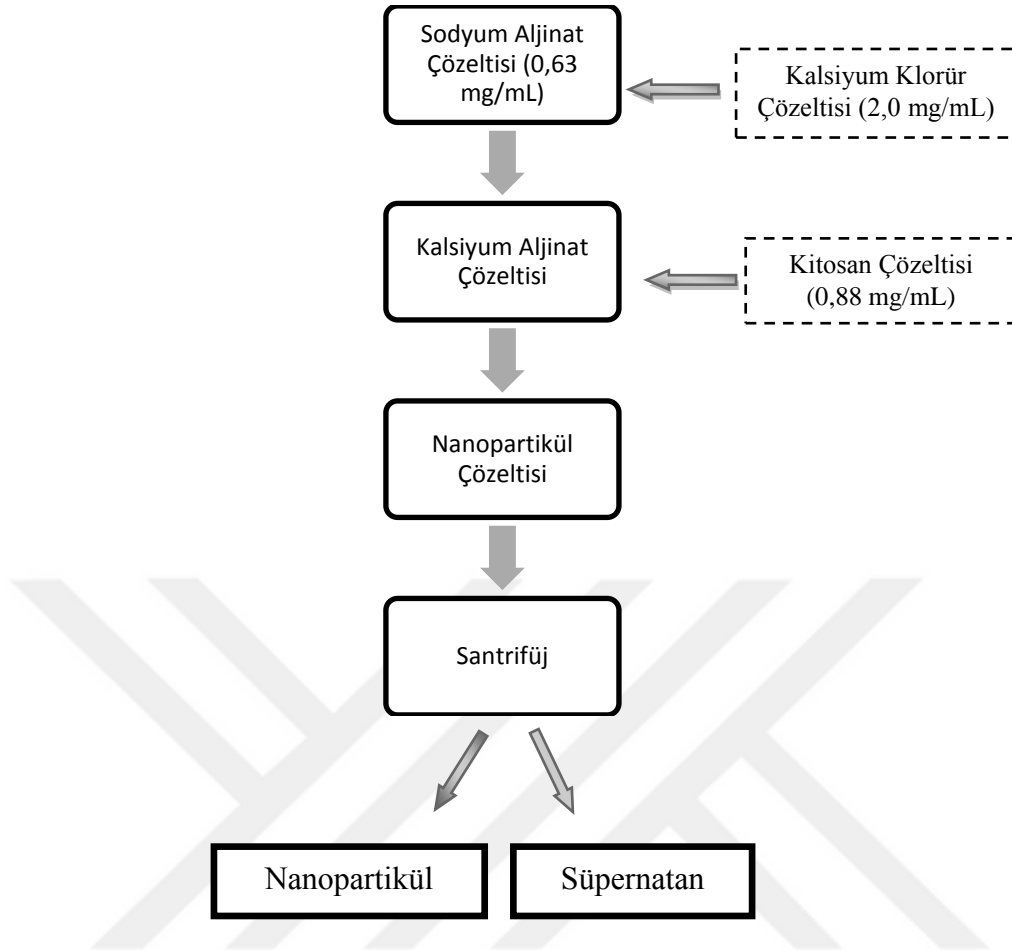
**Şekil 3.9:** Santrifüj öncesi örnekler.

Saf su ile yıkamadan geçirilen nanopartiküller (Şekil 3.10) daha sonra yapılacak olan karakterizasyon işlemleri için petri kaplarına 1 cm<sup>2</sup> genişliğinde yayılarak 40<sup>0</sup>C'lik etüvde iki gün kurumaya bırakıldı. Kurutulan örneklerin SEM ve FTIR karakterizasyonları yapıldı.



**Şekil 3.10:** Santrifüj sonrası etüvde kurutulacak nanopartiküller.

Kitosan-aljinat nanopartiküllerinin hazırlanma şeması Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.11:** Kitosan-sodyum aljinat nanopartikül üretim akış şeması.

En iyi yükleme parametlerinin belirlenmesi için iki farklı antioksidan konsantrasyonunda çalışılmıştır. Elde edilen antioksidandan (5 ve 7 mg/mL) alınarak karışır durumdaki sodyum aljinat (0,63 mg/mL) çözeltisine peristaltik pompa ile saniyede bir damla damlatıldı. 30 dakika karıştırılıp ardından  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi (2.0 mg/mL) bu karışıma damlalar halinde eklendi ve 30 dakika daha karışması sağlandı. Son olarak kaplama için kitosan çözeltisi (0.88 mg/mL) saniyede birer damla damlatılarak eklendi. Karışım oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde bir gece karışmaya bırakıldı. Ertesi gün çözelti santrifüj tüplerine konularak 2800 rpm ve 14000 rpm'lik devirlerde 40 ve 60'ar dakikalarda santrifüjlendi. Süpernatant ve nanopartiküllerin ayrımı gözlemlendi.

### **3.2.4 Kitosan-sodyum aljinat nanopartiküllerinin karakterizasyonları**

Antioksidan madde yükleme işleminden önce ve sonra biyopolimerik nanopartiküllerin yapısal ve morfolojik özelliklerini incelemek için çeşitli karakterizasyon yöntemleri uygulanmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizleri yapıldı.

#### **3.2.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), nanopartiküllerin yüzey yapılarının ve boyutlarının özelliklerinin incelenmesine yardımcı olur. Bunun için 40<sup>0</sup>C'de etüvde kurutulan örnekler toz halinde SEM cihazında incelenmiştir.

#### **3.2.4.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)**

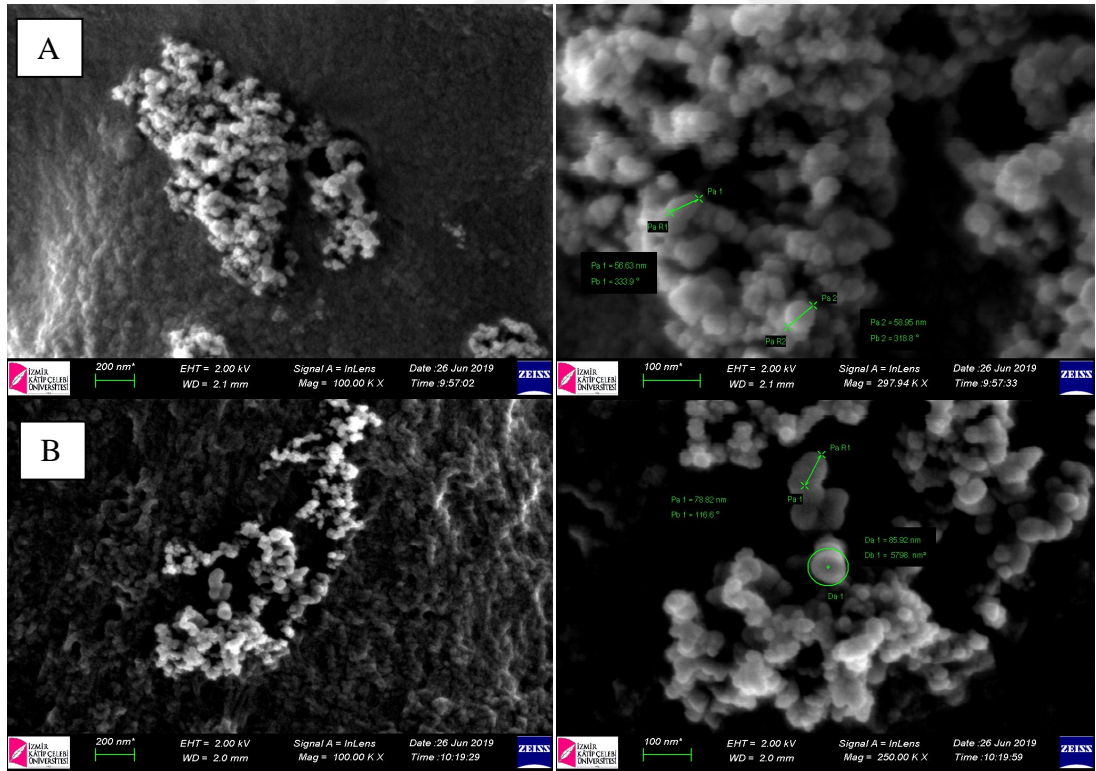
FTIR üretilen nanoparçacıkların aralarında oluşturdukları bağlar hakkında bilgi verir. Örneklerin karakterizasyon için hazırlanması SEM ile aynıdır. Etüvde kurutulmuş örneklerin FTIR ölçümleri alınmıştır.

#### **3.2.4.3 Ultraviyole Görünür Spektroskopisi (UV-Vis)**

UV-Vis ölçülen maddenin moleküler absorpsiyonu hakkında bilgi verir. Kuru nar kabuklarının %100 etanolde (E), %100 suda (S) ve %50 etanol-su (E-S) çözenleri içerisindeki absorpsiyonları okunmuştur.

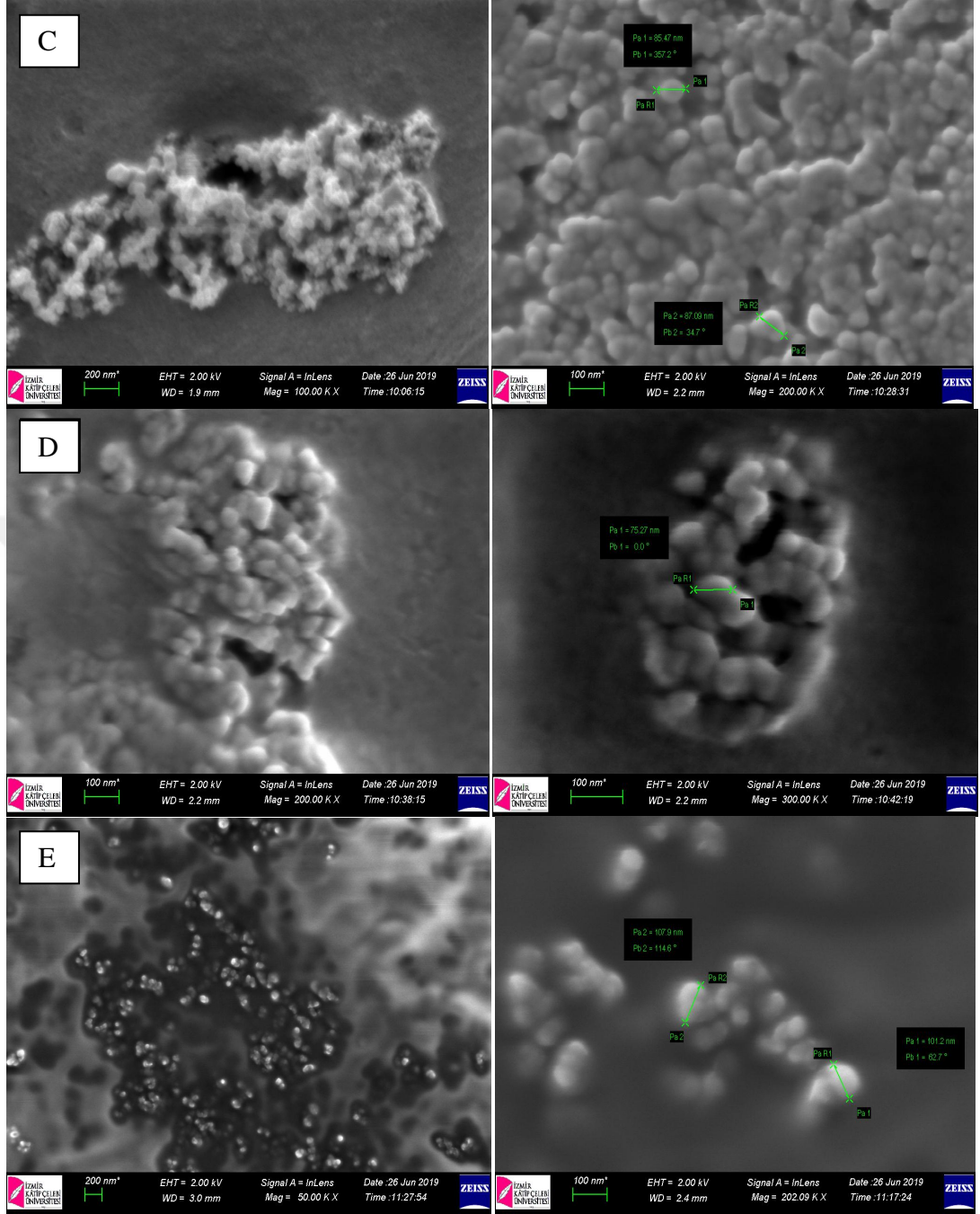
#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

SEM görüntüleri üretilen nanopartiküllerin boyut ve yapısal özellikleri hakkında bilgi verir. Biyopolimerik madde ile çalışıldığında elektriksel iletkenlik düşük olduğundan kaplama yapıldıktan sonra daha sağlıklı görüntüler elde edilebilir. Bu çalışmadaki biyopolimerik nanopartiküller SEM görüntüleri alınmadan önce Altın-Paladyum (Au-Pd) ile 3-15 nm aralığında kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Şekil 4.1’de farklı santrifüj sürelerinde üretilen nanopartiküllerin yükleme yapılmış ve yapılmamış SEM görüntüleri gösterilmektedir. Burada yükleme yapılmamış nanopartiküller (Np), yükleme yapılmış nanopartiküller (YNp) olarak gösterilmiştir.



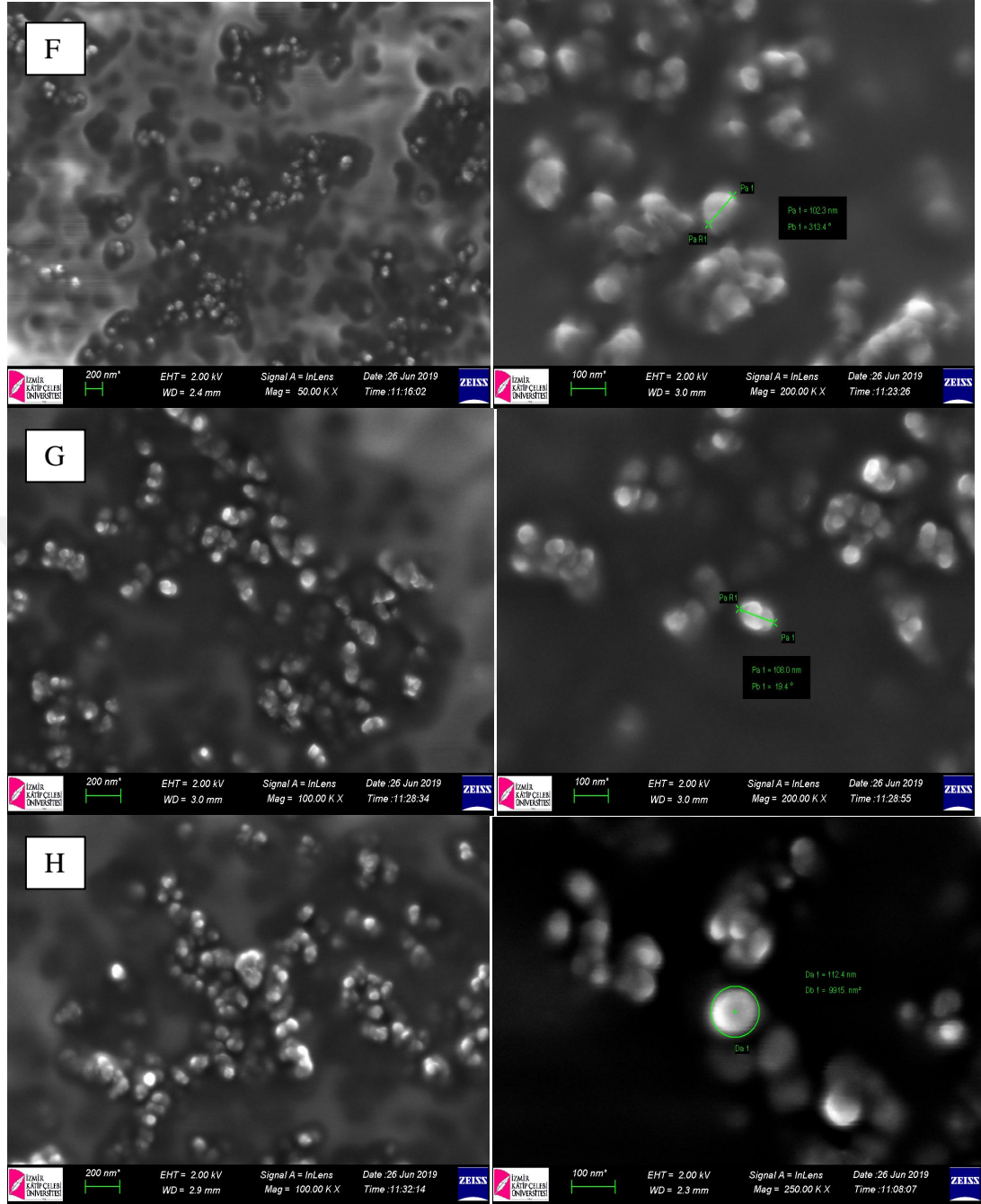
Şekil 4.1 (devam): Farklı santrifüj hızlarında hazırlanan nanopartiküllerin SEM görüntüleri.





**Şekil 4.1 (devam):** Farklı santrifüj hızlarında hazırlanan nanopartiküllerin SEM görüntüleri.





**Şekil 4.1 (devam):** Farklı santrifüj hızlarında hazırlanan nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

(A: 14000 rpm/40 dakika/ Np, B: 14000 rpm/60 dakika /Np, C: 2800 rpm/40 dakika/ Np, D: 14000 rpm/60 dakika/ Np, E: 14000 rpm/40 dakika/ YNp, F: 14000 rpm/60 dakika /YNp, G: 2800 rpm/40 dakika/YNp, H: 14000 rpm/60 dakika/ YNp).

SEM görüntüleri ile ölçülen nanopartiül boyutları ve görüntüleri kıyaslanmış, görüntü sonucu ölçülen nanometrik boyutların kıyaslamaları Tablo 4.1’de ifade edilmiştir. Ölçümler sırasında yükleme yapılmamış nanopartiküller (Np), yükleme yapılmış nanopartiküller (YNp) arasındaki dağılımın uygunluğunu ölçmek adına her örneğin özellikle büyük ve küçük partikül boyutları da dikkate alınarak ortalaması alınmıştır. Yükleme yapılan biyopolimerik nanopartiküllerin yüzeyi daha pürüzsüz iken boş nanopartiküllerin daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.

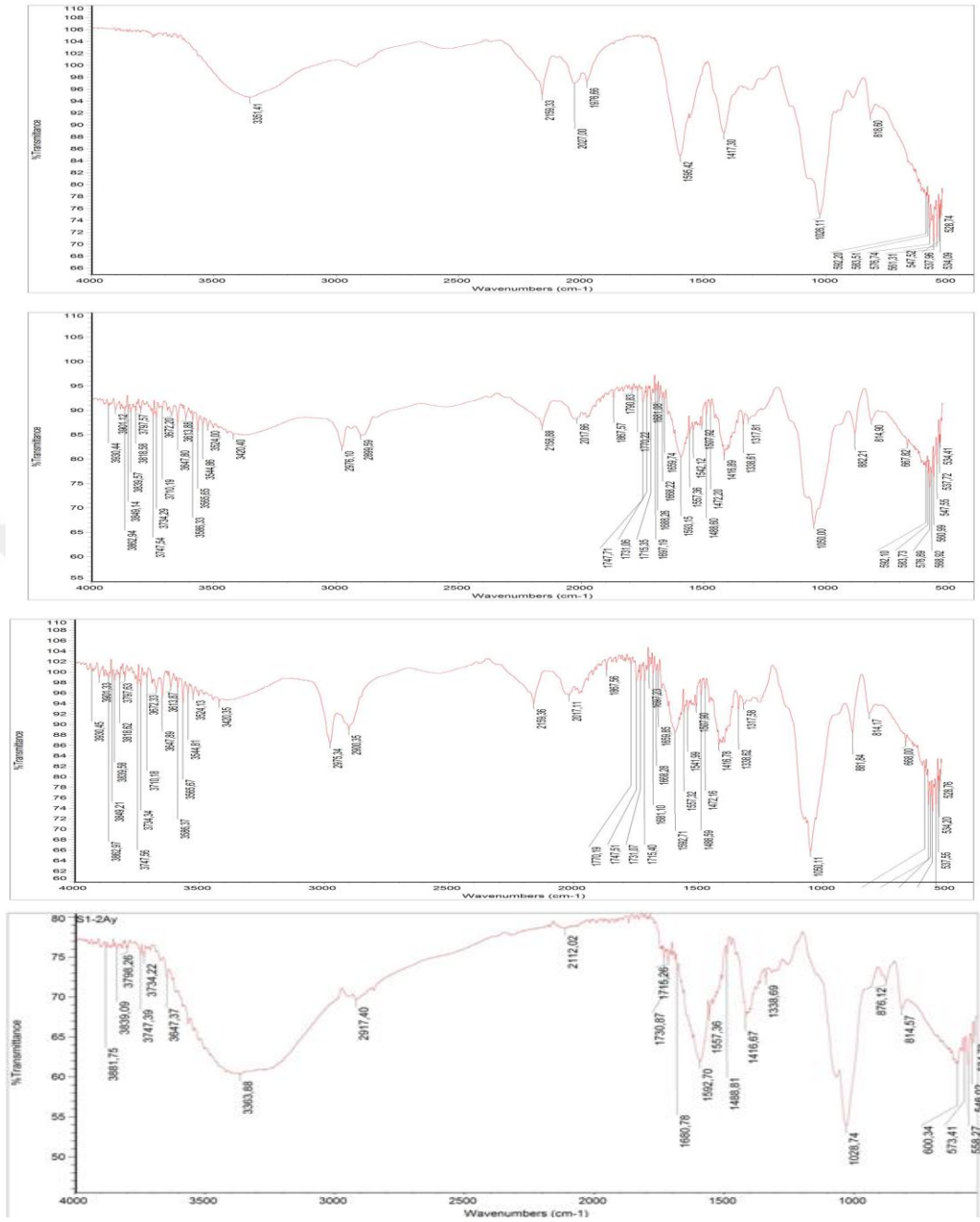
**Tablo 4.1:** Nanopartikül örneklerinin boyut kıyaslaması.

Biyopolimerik Nanopartiküller	Santrifüj hızı (rpm)	Santrifüj süresi (dakika)	Ölçülen boyut aralığı (nm)
NP (Şekil 4.1A)	14000	40	40-90
NP (Şekil 4.1B)	14000	60	50-90
NP (Şekil 4.1C)	2800	40	70-130
NP (Şekil 4.1D)	2800	60	70-90
YNp (Şekil 4.1E)	14000	40	100-140
YNp (Şekil 4.1F)	14000	60	106-130
YNp (Şekil 4.1G)	2800	40	102-110
YNp (Şekil 4.1H)	2800	60	100-115

Daha önce yapılan bir çalışmada iyonik jelasyon yöntemi ile üretilen kitosan-aljinat nanopartiküllerinin büyüklükleri 50-500 nm aralığında bulunmuş, yüzeyin pürüzsüz ve çok gözenekli olduğu belirtilmiştir [58]. Başka bir çalışmada ise yükleme yapılmamış Kitosan nanopartikül büyüklüklerinin 100 nm den küçük olduğu belirtilmiştir [56]. Bu çalışmada elde edilen nanopartikül boyutları ve morfolojileri önceki çalışmalarla uygunluk göstermiştir.

FTIR ölçümleri ölçülen maddenin monomerlerinin arasındaki bağlar hakkında bilgi verir. Yükleme yapıldıktan sonra piklerde değişiklik olur ancak bağlarda kopma gözlenmemesi gerekir. Yükleme yapılmadan önceki ve yükleme yapıldıktan sonra alınan FTIR spektrumlarında bağ kopması gözlemlenmemiş, yapı değişmeden yüklemenin sağlıklı yapıldığı anlaşılmıştır. Bunun sonucunda Şekil 4.2.A’ da 3351

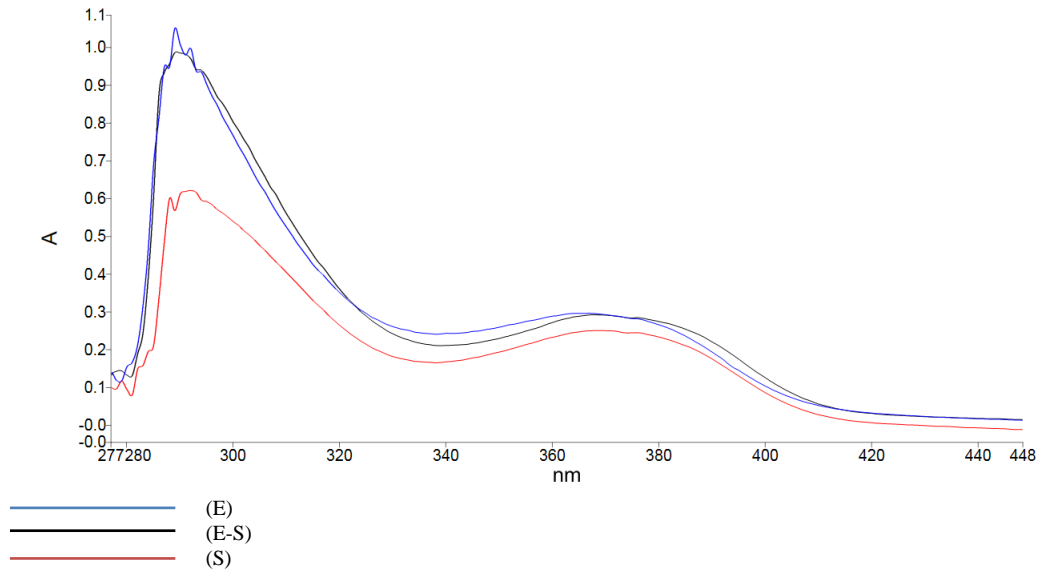
$\text{cm}^{-1}$ 'de görülen pik  $-\text{OH}$  ve  $-\text{NH}$  gruplarının gerilme titreşim hareketlerine işaret etmektedir. Örnek santrifüj yapılmadan sulu çözelti içerisinde bulunduğundan kitosanda hidrojen bağları artmış olduğu, Şekil 4.2.B ve Şekil 4.2.C'ye kıyasla  $-\text{OH}$  gerilme bandının daha yayvan olduğu açıkça görülmektedir ve bu yayvanlığın sonucunda Şekil 4.2.B, Şekil 4.2.C ve Şekil 4.2.D' de net olarak görülen  $2975 \text{ cm}^{-1}$  ve  $2900 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki asimetric ve simetric  $-\text{CH}$  gerilme bantları gözlemlenmemektedir. Nanopartikül sentezinde %100 deasetile kitosan kullanılmadığından deasetile olmamış  $-\text{CONH}_2$  gruplarının varlığını işaret eden  $1599 \text{ cm}^{-1}$  civarında  $\text{C}=\text{O}$  ve  $1416 \text{ cm}^{-1}$  civarında  $\text{C}-\text{N}$  bağ gerilme ve titreşimleri gözlemlenmektedir.  $1050 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki şiddetli pik  $\text{C}-\text{O}$  gerilme titreşim hareketinin bir sonucudur. Santrifüj hızları bazında karşılaştırma yapıldığında Şekil 4.2.B ve Şekil 4.2.C' de küçük, yalnızca madde miktarlarının eşitsizliğinden kaynaklı olabilecek farklılıklar gözlenmektedir. Bu, kimyasal ortam farkı olmadığından beklenen bir durumdur. Şekil 4.2.E' de  $-\text{OH}$  gerilmelerinden sorumlu olan  $3360 \text{ cm}^{-1}$  pikinin genişliği ve şiddeti nanopartikül içerisine yükleme yaptığımız nar ekstratının fenolik ve diğer  $-\text{OH}$  grubu içeren doğal bileşiklerce zengin olduğunu destekler niteliktedir. Elde edilen sonuçlar Mingyu ve arkadaşlarının nanopartiküller için yaptığı çalışmayla benzer bulunmuştur [59].



**Şekil 4.2:** Boş kitosan-sodyum aljinat nanopartiküllerinin FTIR spektrumları. (A: santrifüj öncesi örnekler, B: 2800 rpm’de/yüklemesiz, C: 14000 rpm’de/yüklemesiz, D: 2800 rpm’de yükleme yapılmış, E: 14000 rpm’de/yükleme yapılmış santrifüjlenmiş örnekler).

Nar kabukları farklı çözümler aracılığı ile ultrasonik destekli ekstraksiyonda ekstrakte edilip sonuçları UV-Vis’de incelenmiştir. Ekstreler yalnızca etanolde çözerek (E), 1/1 (v/v) oranında etanol ve su ile çözerek (E-S) ve sadece suda çözerek (S) absorbansları okunmuş, absorbans grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir.

UV-Vis ölçümleri incelendiğinde 280-300 nm aralığında pikler görülmüştür. Örneklerin etanolde ve %50 sulu etanolde çözülen örneklerden 290-300 aralığında maksimum absorbans alınmışken sadece su ile çözerek daha az absorpsiyona ulaşılmıştır. Etanolün çözme etkisi yüksektir ancak çözümlerine su kullanılması hücre parçalarından difüzyonu kolaylaştırdığından benzer verimde sonuçlar gözlemlenebilir. Çalışmalarda kimyasal kullanımını azaltmak adına %50 sulu etanol (ES) tercih edilmiştir. Tarafından yapılan bir çalışmada nar ekstraksiyonunda UV-Vis ölçümü alınmış, en yüksek absorpsiyon 231 nm’de görülmüştür. Çalışmasına kıyasla sadece nar kabukları ile çalışıldığından daha yüksek nanometrelerde sonuç çıkması öngörülmüştür.



**Şekil 4.3:** UV-Vis Spektroskopisi sonuçları.

DPPH inhibisyonu ölçme yöntemine göre 100 µg/mL konsantrasyonda ekstraktler çalışılmış ve % 74.38 inhibisyon göstermiştir. Bu inhibisyon 14.38 µg/mL alfa tokoferole eşdeğer aktivite olarak hesaplanmıştır. 30 dakikalık ölçüm sonunda DPPH radikalinin stok çözeltisinin açık mordan sarıya dönüşen rengi ortamdaki serbest radikalleri süpürdüğüne göstergesidir. Renk değişimi Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.4:** Antioksidan madde analizleri. (A: DPPH reaktifi stok çözeltisinin analiz öncesi rengi. B:30 dakika sonundaki DPPH reaktifinin renk değişimi).

Toplam fenolik madde miktarı gallik asit ile çizilen standart ölçü eğrisi ve hesaplanan regresyon denklemine göre %2.82 olarak hesaplanmıştır. Toplam flavonoid tayini spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Toplam flavonoid miktarları ise kateşin ile çizilen standart ölçü eğrisi ve hesaplanan regresyon denklemine göre %0,656 total flavonoit içerdiği tespit edilmiştir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, iyonik jelasyon yöntemiyle üretilen farklı santrifüj devirlerinde ve sürelerinde çalışılan kitosan-soydum aljinat nanopartiküllerinin karakterizasyon ve optimizasyon çalışmaları yapılmış, nar kabuklarından elde edilen fenolik maddelerin bu biyopolimerik nanopartiküllere yüklemesi incelenmiştir. SEM sonuçlarına bakıldığında yüksek santrifüj hızının nanopartikül boyutlarına etki ettiği, ancak santrifüj süresinin (40 ve 60 dakika) dikkate değer etki etmediği görülmüştür. Yükleme her iki hızda ve sürede üretilen nanopartiküllere başarılı bir şekilde yapıldığı hem boyut hem şekil olarak fark edilmiştir. FTIR sonuçlarında antioksidan maddenin yüklendiği, pikler arasındaki farklılıklar sayesinde sonuçlara yansıdığı görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada, biyopolimerik nanopartiküllerin karakterizasyonları başarılı bir şekilde yapılmış, çalışma şartları optimize edilmiştir. En iyi nanopartikül yapısı 14000 rpm devirde 40 dakika santrifüjlenmiş örneklerde tespit edilmiştir. Yapılan antioksidan ve fenolik madde analizlerinde nar kabuklarının ekstraktlarından yüksek oranda antioksidan madde ve fenolik madde elde edildiği görülmüştür. Daha önce yapılan meyve ekstraktları analizlerine kıyasla nar kabuğunun birçok meyveden daha yüksek antioksidan madde içerdiği anlaşılmıştır. Farklı oranlarda su ve etanolla ekstraktlar elde edilip UV-Vis sonuçları alındığında etanol ve sulu etanol arasında çok fark olmadığı, sadece su ile ekstraksiyon için yöntemin güçlendirilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Nar kabuklarından ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile daha az çözücü ile antioksidan elde edilmiş ve yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılacak olan antioksidan gibi ekstrakte maddelerin üretiminde yüksek konsantrasyonlarda metanol ve aseton gibi çözücülere ihtiyaç duyulmadan insan sağlığına olumsuz etkisi olmadan ekstraksiyon işleminin yapılabileceği görülmüştür. Bu konuda yapılan çalışmaların yetersiz olduğu fark edilerek bu alanda yapılacak olan yeni ve diğer çalışmalara da ışık olmak amaçlanmıştır. Elde edilen antioksidan yüklü biyopolimerik nanopartiküller sayesinde kontrollü salım mümkün

olmakla birlikte, farklı alanlarda da kullanımı söz konusu olabilmektedir. Özellikle sporcular, sigara içenler, kanser hastaları ve orta yaş üstü kişilerin daha fazla tüketmesi gereken antioksidanların gıda takviyesi olarak kullanımına uygun nutrasötiklerin üretilmesine ışık tutulması hedeflenmiştir. Nar kabuklarından elde edilen fenoliklerin vücuda uyumluluğunu ve bu ortamlardaki davranışlarını incelemek adına salım ve biyouyumluluk çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada ön koşulların hazırlanması ve stabilizasyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon yöntemlerinin daha az çözücü ile yapılarak daha yeşil çevre politikasının belirlenmesi, atık olarak düşündüğümüz maddelerin değerlendirilmesi üzerine daha çok çalışmalar yapılması ve biyopolimerler sayesinde insan tüketimine uygun hale getirilmesi konusunda daha çok araştırmalar yapılması gerekmektedir.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol*, 27(2): 175-194.
- [2] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., & Agric, J. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Food Chemistry*, 23;53(6):1841-56.
- [3] Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A., & Martins, D. (2004). Anthocyanin concentration of 'assaria' pomegranate fruits during different cold storage conditions. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 5:338– 342.
- [4] Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to lld, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71:1062-1076.
- [5] Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release- A Review. *International Journal of Science and Technology*, 41: 1-21.
- [6] Gökmen, S., Palamutoğlu R., & Sariçoban C. (2012). Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1)36-50.
- [7] Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3): 1133-1174.
- [8] Lin, Y. H., Liang, H. f., Chung, C. K., Chen, M. C., & Sung, H. W. (2005). Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 26(14): 2105-2113.
- [9] Kulkarni, A. P., & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93(2): 319-324.
- [10] Cemeröglü, B., Artık, N., & Yüncüler, O. (1988). Nar suyu üzerinde araştırmalar. *Doğa, Türk Tarım Ve Ormancılık Dergisi*, 12(3), 322-334.
- [11] Firuzi, M. R., Niakousari, M., Eskandari, M. H., Keramat, M., Gahruie, H. H., & Khaneghah, A. M. (2019). Incorporation of pomegranate juice concentrate and pomegranate rind powder extract to improve the oxidative stability of frankfurter during refrigerated storage. *Lwt-Food Science and Technology*, 102: 237-245.
- [12] Fazaeli, M., Yousefi, S., & Emam-Djomeh, Z. (2013). Investigation on the effects of microwave and conventional heating methods on the phytochemicals of pomegranate (*punica granatum l.*) and black mulberry juices. *Food Research International*, 50, 568–573.

- [13] Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chemistry*, 261: 75-86.
- [14] Kim, N. D., Mehta, R., Yu, W., & Lansky, E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71, 203–217.
- [15] Zargari, A. (1996). Medicinal plant, 2. Tehran, Iran: *University of Tehran Publication*, 465.
- [16] Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80, 393–397.
- [17] Rather, R. A., Swetha, C., & Rajagopal, K. (2010). Screening of peel extracts as antioxidants, anticancer agents and antimicrobials. *Advances in BioResearch*, 1(1), 29–33.
- [18] Cheng, X. L., Wan, J. Y., Li, P., & Qi, L. W. (2011). Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *spatholobus suberectus*. *Journal of Chromatography*, 1218, 5774–5786.
- [19] Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- [20] Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- [21] Apaydın, E. (2008). Nar suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antioksidan aktivitedeki değişimler, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [22] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of iranian *ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550.
- [23] Quinones, J. P., Peniche, H., & Peniche, C. (2018). Chitosan based self-assembled nanoparticles in drug delivery. *Polymers (Basel)*, 10(3).
- [24] Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesaro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2): 219-228.
- [25] Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3): 126-139.
- [26] Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection*, 73, 1737–1761.
- [27] Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., & Heber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, 41(1), 49-55.

- [28] Harini, K., Mohan, C. C., Ramya, K., Karthikeyan, S., & Sukumar, M. (2018). Effect of *Punica granatum* peel extracts on antimicrobial properties in Walnut shell cellulose reinforced bio-thermoplastic starch films from cashew nut shells. *Carbohydrate Polymers*, 184: 231-242.
- [29] Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., & Atik, U. (2012). Serbest radikaller, *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 52-58.
- [30] Chemat, F., Huma, Z., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.
- [31] Vilkhru, K., Mawson, R., Simins, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 161–169.
- [32] Jacob, J., Haponiuk, J. T., Thomas, S., & Gopi, S. (2018). Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materials Today Chemistry*, 9: 43-55.
- [33] Poncelet, D. (2006). Microencapsulation: Fundamentals, methods and applications. *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*, Netherlands, Pp. 23-34.
- [34] Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10): 510-523.
- [35] Coruhli, T. (2013). Kara dut antosiyaninlerinin iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve enkapsülasyon parametrelerinin tepki yüzeyi metodu ile optimize edilmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.
- [36] Asgari, S., Saberi, A. H., Clements, D. J., & Lin, M. (2019). Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles. *Trends in Food Science & Technology*, 86: 118-130.
- [37] Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering*, 80: 771-784.
- [38] Zhang, E., Xing, R., Liu, S., Qin, Y., Li, K., & Li, P. (2019). Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. *Carbohydrate Polymers*, 222: 115004.
- [39] Yu, S., Xu, X., Feng, J., Liu, M., & Hu, K. (2019). Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 560: 282-293.
- [40] Muley, A. B., Ladole, M. R., Suprasanna, P., & Dalvi, S. G. (2019). Intensification in biological properties of chitosan after gamma-irradiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131: 435-444.
- [41] Kaczmarek, B., Owczarek, A., Nadolna, K., & Sionkowska, A. (2019). The film-forming properties of chitosan with tannic acid addition. *Materials Letters*, 245: 22-24.
- [42] Wang, H., Gong, X., Miao, Y., Guo, X., Liu, C., Fan, Y. Y., Zhang, J., Niu, B., & Li, W. (2019). Preparation and characterization of multilayer films composed of chitosan, sodium alginate and carboxymethyl chitosan-ZnO nanoparticles. *Food Chemistry*, 283: 397-403.
- [43] Gün, M. (2013). Aljinat-kitosan nanopartiküllerin kolşisin salımında kullanılmasının araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes

Üniversitesi, Aydın.

- [44] Lin, H., Liang, H. F., Chung, C., Chen, M., & Sung, H. (2005). Physically crosslinked alginate/n,o-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 26, 2105-2113
- [45] Kaygusuz, H. (2011). Biyopolimer–kil nanokompozitlerinden kontrollü protein salımı, İstanbul Yıldız Teknik Üniversitesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.
- [46] Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J., & Luo, Y. (2011). Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 22(3): 608-615.
- [47] Robles, R., Rojas, M., Odriozola, I., González, G., & Martin, O. (2013). Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut kent mangoes. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1): 240-246.
- [48] Wu, H., Liao, C., Jilao, Q., Wang, Z., Cheng, W., & Wan, Y. (2012). Fabrication of core–shell microspheres using alginate and chitosan–polycaprolactone for controlled release of vascular endothelial growth factor. *Reactive and Functional Polymers*, 72(7): 427-437.
- [49] Nalini, T., Basha, S. K., Sadiq, A. M. M., Kumari, V. S., & Kaviyarasu, K. (2019). Development and characterization of alginate / chitosan nanoparticulate system for hydrophobic drug encapsulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52: 65-72.
- [50] Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S., & Khuller, G. K. (2006). Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 48: 171-176.
- [51] Sarmiento, B., Ferreira, D. C., Jorgensen, L., & Weert, M. (2007). Probing insulin's secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65: 10-17.
- [52] Li, P., Dai, Y. N., Zhang, J. P., Wang, A. Q., & Wei, Q. (2008). Chitosan alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*, 4: 221- 228.
- [53] Kaderides, K., Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2015). A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31: 204-215.
- [54] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106:804-810.
- [55] Rodrigues, S., Pinto, G. A. S., Fernandes, F. A. N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 95-100.
- [56] Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Carrera, C. A., & Palma, M. (2019). Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. *Food Chemistry*, 288: 221-227.

- [57] Bakht, M. A., Geesi, M. H., Riadi, Y., Imran, M., Ali, M. I., Ahsan, M. J., & Ajmal, N. (2019). Ultrasound-assisted extraction of some branded tea: Optimization based on polyphenol content, antioxidant potential and thermodynamic study. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(5): 1043-1052.
- [58] Venkatesan, J., Lee, J. Y., Kang, D. S., Anil, S., Kim, S. K., Shim, M. S., & Kim, D. G. (2017). Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles. *International Journal Biological Macromolecules*, 98: 515-525.
- [59] Ji, M., Sun, X., Guo, X., Zhu, W., Wu, J., Chen, L., Wang, J., Chen, M., Cheng, C., & Zhang, Q. (2019). Green synthesis, characterization and in vitro release of cinnamaldehyde/sodium alginate/chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 90: 515-522.



## ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Aylin KAZOLUK
2. **Doğum Tarihi:** 29/05/1992
3. **Ünvanı:** Yüksek Lisans Öğrencisi
4. **Öğrenim Durumu**

DERECE	ALAN	ÜNİVERSİTE	YIL
Yüksek Lisans	Nanobilim ve Nanoteknoloji	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi	2019-
Lisans	Gıda Mühendisliği	Celal Bayar Üniversitesi	2016
Ön Lisans	Gıda Teknolojisi	Ege Üniversitesi	2013

## 5. İş tecrübesi

UNVAN	ALAN	KURUM	YIL
Satış Müdürü	Satış-Pazarlama	Ebrar Gayrimenkul	2017-

## 6. Yayınlar

1. Kazoluk Aylin, Aykaç Ahmet, Uzunbayır Berkant. (2018). "Synthesis and Characterization of Biodegradable Sodium Alginate-Chitosan Polymeric Nanoparticles" 2. Uluslararası Öğrenci Fen Bilimleri Kongresi (Konuşmacı-Tam metin)

2. Kazoluk Aylin, Aykaç Ahmet. (2017). “Production of Nanoparticles with Sodium Alginate and Chitosan” 1. Uluslararası Öğrenci Fen Bilimleri Kongresi (Metin)

## **7. Başarılar / Ödüller**

Ege Üniversitesi Gıda Teknolojisi bölüm **birinciliği**

