



# EGE ÜNİVERSİTESİ

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### KARA HAVUÇ BİTKİSİNDEN FARKLI YÖNTEMLER İLE ANTOSİYANİN ELDESİNİN OPTİMİZASYONU, ENKAPSÜLASYONU VE NEURO 2A KANSER HÜCRE HATTINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

**Cansu PALA**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ**

**İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 612.01.01**

**Sunuş Tarihi : 08.08.2014**

**Bornova-İZMİR**

**2014**

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**KARA HAVUÇ BİTKİSİNDEN FARKLI YÖNTEMLER  
İLE ANTOSİYANİN ELDESİNİN OPTİMİZASYONU,  
ENKAPSÜLASYONU VE NEURO 2A KANSER  
HÜCRE HATTINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Cansu PALA**

**Tez Danışmanı : Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ**

**İkinci Danışmanı : Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 612.01.01**

**Sunuş Tarihi : 08.08.2014**

**Bornova-İZMİR**

**2014**

Cansu PALA tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Kara havuç bitkisinden farklı yöntemler ile antosiyanin eldesinin optimizasyonu, enkapsülasyonu ve Neuro 2A kanser hücre hattına etkisinin incelenmesi” başlıklı bu alışma E.. Lisansüstü Eğitim ve ğretim Yönetmeliği ile E.. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve ğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.08.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri yeleri:**

**mza**

<b>Jüri Başkanı</b>	: .....	.....
<b>Raportör ye</b>	: .....	.....
<b>ye</b>	: .....	.....
<b>ye</b>	: .....	.....
<b>ye</b>	: .....	.....

## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kara havuç bitkisinden farklı yöntemler ile antosiyanin eldesinin optimizasyonu, enkapsülasyonu ve Neuro 2A kanser hücre hattına etkisinin incelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .... / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

**ÖZET****KARA HAVUÇ BİTKİSİNDEN FARKLI YÖNTEMLER İLE  
ANTOSİYANİN ELDESİNİN OPTİMİZASYONU, ENKAPSÜLASYONU  
VE NEURO 2A KANSER HÜCRE HATTINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

PALA, Cansu

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL

Ağustos 2014, 78 sayfa

Yapılan çalışmada Türkiye’de özellikle İç Anadolu Bölgesinde yetiştiriciliği yapılan ve şalgam olarak bilinen içeceğin ana maddelerinden birini oluşturan kara havuç (*Daucus carota L. var. Atorubens (Alef.) E.*) bitkisinden antosiyanin aktif bileşenlerinin çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmesi, enkapsülasyonu ve Neuro 2-A kanser hücre hattında sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Farklı yöntemlerin uygulandığı ve optimize edildiği ekstraksiyon basamağında solvent ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyonu ve mikrodalga ekstraksiyonundan elde edilen antosiyanin miktarları sırası ile; 2090,4 µg/mL, 1825,2 µg/mL ve 1540,4 µg/mL’dir. Beyin tümörü hücreleri (neuroblastomlar) hedeflendiği için enkapsülasyon aşamasında partikül boyutu 100 nm olan formulasyon geliştirildi ve enkapsülasyon verimi % 85 olarak bulundu. *In vitro* dissolüsyon çalışmalarında hazırlanan formulasyondan antosiyanin salımının bir hafta sürdüğü belirlendi. İnhibe edici doz aralığının 100 µg/ml ve 6.25 µg/ml aralığında test edildiği sistemimizde Neuro 2-A hücre hattı için inhibe edici miktara 6.25 µg/ml konsantrasyonda ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kara havuç, mikrodalga yardımcı ekstraksiyon, sonikasyon, optimizasyon, antosiyanin, enkapsülasyon, sitotoksik aktivite, kanser, Neuro 2-A



**ABSTRACT****OPTIMIZATION OF ANTHOCYANINS FROM BLACK CARROT,  
ENCAPSULATION AND INVESTIGATION OF ITS EFFECTS ON  
NEURO 2A CANCER CELL LINE**

PALA, Cansu

MSc in Bioeng.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL

August 2014, 78 pages

In this study, it is aimed to obtain anthocyanin active molecules from black carrot (*Daucus carota L. var. Atorubens (Alef.) E.*) which is cultivated specially in Turkey, Central Anatolia Region and one of the main products of traditional Salgham beverage in Turkey, using different extraction techniques, encapsulation and investigation their cytotoxic effects on different cancer cell lines. In the extraction step which different extraction techniques are applied and optimized, the extraction yield of solvent extraction, ultrasonic extraction and microwave-assisted extraction are 2090,4 µg/mL, 1825,2 µg/mL ve 1540,4 µg/mL, respectively. 100 nm particle size formulation is developed as brain tumor cells (neuroblastoma) are targeted in the encapsulation step and encapsulation yield is calculated as 85 %. Release of anthocyanin lasted for one week during dissolution test. Inhibition dosage range were determined between 100 µg/ml and 6.25 µg/ml. Inhibition concentration is obtained at 6.25 µg/ml for Neuro 2-A cell line.

**Keywords:** Black carrot, microwave assisted extraction, sonication, optimization, anthocyanin, encapsulation, cytotoxic activity, cancer, Neuro 2-A





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ ve Sayın Doç. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL'e teşekkürlerimi sunarım.

HPLC analizlerimin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen; Arş. Gör. Şeref AKAY ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi FABAL Birimine teşekkür ederim.

Bu çalışma 113M196 nolu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Çalışmalarım, eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, manevi yardımları ile destek olan aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxi
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 Kara havuç ( <i>Daucus carota</i> L. var. <i>Atrorubens</i> (Alef.) E.).....	2
2.1.1 Kara havuçta bulunan fenolik bileşikler .....	4
2.1.2 Kara Havucun Kullanım Alanları .....	5
2.1.3 Kara havucun terapotik özellikleri.....	6
2.2. Antosiyaninler.....	6
2.2.1. Antosiyaninlerin stabilitesi .....	8
2.2.2. Antosiyaninlerin antioksidan özellikleri.....	11
2.2.3. Antosiyaninlerin antikanser özellikleri.....	12
2.3. Ekstraksiyon metotları .....	15

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.3.1. Solvent Ekstraksiyonu (Klasik Yöntem).....	16
2.3.2. Ultrasonik Ekstraksiyon.....	16
2.3.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu .....	17
2.4. Yüzey yanıt metodolojisi ve optimizasyon parametreleri.....	19
2.5. Enkapsülasyon teknikleri .....	19
2.5.1. Antosiyaninlerin enkapsülasyonu .....	21
2.5.2. Sol-gel Yöntemi .....	22
2.5.3. İyonik jelasyon ile enkapsülasyon .....	25
2.6. Nanopartiküler Sistemler .....	26
2.7. Beyin kanseri vakaları ve neuro 2-A hücre hattı.....	27
2.8. Kan-beyin bariyeri .....	28
3. MATERYAL VE METOT .....	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	30
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	31
3.3. Ön İşlemler.....	33
3.4. Ekstraksiyon İşlemleri.....	33
3.4.1. Solvent Ekstraksiyonu.....	33

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.4.2. Ultrasonik Ekstraksiyon .....	34
3.4.3. Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon .....	35
3.5. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi .....	36
3.5.1 pH farklılığı yöntemi .....	36
3.5.2. UPLC analizi .....	37
3.6. Toplam fenol miktarının belirlenmesi .....	39
3.7. DPPH analizi .....	40
3.8. Enkapsülasyon işlemi .....	41
3.8.1. Sol-gel yöntemi.....	41
3.8.2. İyonik jelasyon ile enkapsülasyon .....	42
3.9. Dondurulan Örneklerin Liyofilize edilmesi.....	43
3.10. Karakterizasyon çalışmaları.....	44
3.10.1. Zeta potansiyeli ve partikül boyutunun ölçülmesi.....	44
3.10.2. Yükleme veriminin belirlenmesi .....	44
3.10.3. <i>In vitro</i> salım kinetiklerinin belirlenmesi .....	45
3.10.4. DSC (Diferansiyel Tarama Kalorimetresi) Yöntemi.....	45

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.10.5. Nanopartiküllerin SEM Görüntüleri .....	45
3.11. Sitotoksisite Testleri.....	46
3.11.1. Neuro 2-A hücre hattı kültür koşulları.....	46
3.11.2. Serbest haldeki ekstrelerin ve boş ve etken madde içeren partiküllerin Neuro 2-A hücre hattına sitotoksik etkisinin belirlenmesi (MTT testi).....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	48
4.1. Ekstrelerin Antosiyanin Miktarları .....	48
4.1.1 Solvent Ekstraksiyonu.....	49
4.1.2. Ultrasonik Ekstraksiyon .....	49
4.1.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu .....	50
4.2. UPLC analizi ile antosiyanin miktarının belirlenmesi .....	51
4.3. Kara havuçta bulunan toplam fenol miktarı.....	53
4.4. Kara havucun serbest radikal süpürme aktivitesi.....	53
4.5. Karakterizasyon çalışmaları .....	54
4.5.1. Zeta potansiyeli ve partikül boyutu.....	54
4.5.2. Yükleme verimi.....	56
4.5.3. <i>In vitro</i> salım kinetikleri.....	56

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.5.4. DSC analiz sonuçları.....	57
4.5.5 SEM görüntüleri.....	59
4.5.6 MTT testi sonuçları.....	61
5. SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	78





## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2.1 Temel antosiyanin bileşiklerinin yapıları .....	7
2.2.2 Flavilyum katyonunun temel yapısı.....	8
2.3.3 Mikrodalga ekstraksiyon cihazı (kapalı kap sistemi) .....	18
2.5.3 (a) Kitosanın moleküler yapısı (b) tripolifosfat polianyonunun moleküler yapısı (c) ve (d) sırasıyla bu moleküllerin basitleştirilmiş şematik gösterimi .....	26
3.6 Gallik asit kalibrasyon eğrisi .....	40
3.8.1 Sol-gel yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması.....	42
3.8.2 İyonik jelasyon yöntemi ile nanopartiküllerin oluşumu .....	43
4.1.1 Solvent ekstraksiyonu için istenen nokta değerleri .....	49
4.1.2 Ultrasonik ekstraksiyon için istenen nokta değerleri.....	50
4.1.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon için istenen nokta değerleri.....	50
4.2 Ekstrelerin 520 nm deki UPLC kromatogramları.....	52
4.5.3 <i>In vitro</i> salım grafikleri.....	56
4.5.6 Kara havuç ekstresinin (KH) ve iyonik jelasyon ile kaplanmış ekstrelerin (KHE) çeşitli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.....	61



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1 Türkiye’de meyve suyuna işlenen başlıca meyvelerin üretimi (bin ton).....	3
2.2.2 Meyve suyuna işlenen meyve ve sebze miktarları (bin ton).....	3
3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler .....	31
3.2 Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar .....	32
3.4.1 Solvent ekstraksiyonu denemeleri .....	34
3.4.2 Ultrasonik ekstraksiyon denemeleri .....	35
3.4.3 Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon denemeleri .....	36
3.6 Fenol tayini için kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	39
4.1 pH farklılığı yöntemine göre hesaplanan antosiyanin miktarları .....	48
4.3 Kara havuç ekstratlarının toplam fenol miktarları .....	53
4.4 Kara havuç ekstratlarının antioksidan aktivite miktarları .....	53
4.5.1 İyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyon sonucu elde edilen partikül boyutları .....	55

## 1. GİRİŞ

Hipokrat (M.Ö. 460-359)'ın sıklıkla tekrarladığı bir sözü “ Yiyecekleriniz ilaç, ilacınız yiyecekleriniz olsun”.

Son yıllarda besin değerleri açısından farkındalığın artması nedeni ile havuç popülerlik kazanan, ekonomik olarak önemli bir bahçe bitkisidir. Karotenoidler, antosiyaninler ve diğer fenolik bileşikler gibi fitokimyasal maddeleri içerdiğinden insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İçerisinde bulunan bu fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği *in vitro* koşullarda çalışılmış ve ayırma yöntemi olarak solvent ekstraksiyonu uygulanmıştır. Antosiyaninler sıcaklığa duyarlı bileşikler olduğu için alternatif ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak yüksek verimlilikte elde edilmeleri, uygulamanın sanayi ölçeğine taşınması anlamında son derece önemlidir.

Kara havucun Hindistan'dan Avrupa'ya kadar birçok bölgede farklı türleri olmasına rağmen dünya çapında kara havuç üretiminin büyük bir bölümü ülkemizde gerçekleşmektedir. Turuncu havuçlardan yaklaşık 28 kat fazla antosiyanin içeren kara havuçlar içerdiği fenolik bileşiklerin ilaç, gıda ve boya maddesi olarak birçok endüstride değerlendirildiği incelenen çalışmalarda görülmüştür. Besin olarak alınan antosiyaninler antioksidan olarak, enflamasyonu ve lipid oksidasyonunu azaltarak, enflamasyon önleyici ve damar koruyucu etkileri ile, faz 2 enzimleri aktivitesinin ve apoptozun başlamasına neden olarak kardiyovasküler hastalıklardan ve kanserden korumaktadırlar.

Bu çalışmada, kara havuç bitkisinden antosiyaninlerin ekstraksiyonunun farklı yöntemler için optimizasyonunun gerçekleştirilmesi, antosiyanin içeriği en zengin olan ekstrenin enkapsülasyonu için formülasyon geliştirilmesi ve ilaç etken maddesi olarak kanserle mücadele amaçlı kullanımının etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir ve çalışmalar 3 adımda gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta ülkemizde üretimi özellikle İç Anadolu Bölgesinde yaygın olarak yapılan kara havuç bitkisinden antosiyanin moleküllerinin ekstraksiyonunun optimizasyonu hedeflenmiştir. Bunu izleyen 2. basamakta ekstrelerin enkapsülasyonu ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Son olarak 3. adımda ekstrelerin, kaplanmış haldeki ekstrelerin ve boş formülasyonların sitotoksik aktivitelerine Neuro 2-A hücrelerinde bakılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kara Havuç (*Daucus carota L. var. Atrorubens (Alef.) E.*)

Havuç bitkisinin turuncu, beyaz, sarı, kırmızı ve mor renklerde çeşitleri bulunmaktadır. Bu havuç çeşitleri farklı miktarlarda ve kombinasyonlarda makronutrientler, lif, vitaminler, minareler ve karotenoidler, fenolik asitler, antosiyaninler, isokumarinler, terpenler ve seskiterpenlerin de dahil olduğu fitokimyasalları içerir (Metzger et al., 2008; Sun et al., 2009; Poudyal et al., 2010).

Turuncu havuçların rengi içerdikleri yüksek orandaki  $\alpha$  ve  $\beta$  karotenden ileri gelmektedir. Kırmızı havuçların rengini içeriğinde bulunan likopen maddesi verirken, sarı havuçların ise lutein içeriği bu havuçlara rengini vermektedir. Beyaz havuçlar ise tüm karotenoid çeşitlerinin daha az konsantrasyonlarını içerdikleri için bu renktedirler. Kara havuçların rengini ise içeriğinde yüksek oranda bulunan antosiyaninler vermektedir (Sun et al., 2009; Charron et al., 2009; Poudyal et al., 2010). Kara havuç turuncu havuçlara göre yaklaşık olarak 28 kat daha fazla antosiyanin içermektedir.

Kara havuç kökü sebze olarak kullanılan bir bitkidir. Yaprakları çok parçalı, çiçekleri ise şemsiye biçiminde bir arada, küçük, beyaz ve sıktır. Siyah havuç kasım ve aralık aylarında hasat edilir. İyi gelişmesi için derin, yumuşak ve kumlu topraklara ihtiyaç duyar (İyiçinar, 2007). İyi gelişme göstermesi için gerekli ortam şartları ise; az ışık, yüksek rutubet ve nispeten düşük sıcaklıktır. Optimum gelişim özellikleri açısından 15-21°C'lik sıcaklık yeterlidir. İlkbaharda yetiştirilen havuçların renginin sonbahar ve kışın yetiştirilenlere göre daha iyi ve gösterişli olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Özen, 2008).

Kara havucun başlıca üretimi ülkemizde, orta ve uzak doğuda binlerce yıldan beri yapılmaktadır. Ülkemizde özellikle Konya'nın Ereğli ilçesinde kara havuç yetiştiriciliği yapılmaktadır. Siyah havuç hem çiğ (salata ve turşularda) hem de yemeklere katılarak tüketilebilir. Ülkemizde sıklıkla tüketilen fermente içecek türü olan şalgamın da hammaddelerinden biridir.

Türkiye Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (MEYED) 2011 raporuna göre yetiştirilen kara havuç miktarının (Çizelge 2.1.1) meyve suyuna işlenen kara havuç miktarının (Çizelge 2.1.2) oldukça üzerinde kaldığı belirlenmiştir. Kara

havuç lkemizde Şalgam olarak bilinen fermente sıvının hammaddelerinden birisidir. Çiğ olarak salatalara katılmakla birlikte ülkemizde sebze olarak tknetimi pek yaygın değildir. Meyve suyu pazarında beklenen ilgiyi göremeyen üretilmiŐ bu fazla kara havuçların gıda boyası veya farmasötik olarak kullanımına iliŐkin atılımlar ilerleyen dönemlerde değerlendirilmelerini sağlayacaktır (**Türkiye Meyve Suyu V.B. rnler Sanayi Raporu, Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (Meyed), 2011**).

Çizelge 2.1.1 Türkiye’de meyve suyuna işlenen başlıca meyvelerin üretimi (bin ton).

MEYVE	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Elma	2.570	2.002	2.458	2.505	2.782	2.600
Kayısı (*)	894	483	590	751	695	476
Őeftali	510	553	539	552	547	539
ViŐne	140	122	180	185	192	195
Portakal	1.445	1.536	1.441	1.427	1.690	1.710
zm	3.850	4.000	3.613	3.918	4.265	4.255
Nar	80	91	107	128	171	208
Limon	600	710	651	672	784	787
ilek	200	211	251	261	292	300
Ayva	100	106	95	95	96	121
Domates	10.050	9.855	9.937	10.985	10.746	10.052
Armut	360	318	356	356	384	380
Sarı Havu	370	371	544	549	566	487
Siyah Havu	18	24	98	42	28	46
Greyfurt	150	180	163	168	190	214
Mandalina	715	791	744	756	846	859
<b>TOPLAM</b>	<b>22.052</b>	<b>21.353</b>	<b>21.767</b>	<b>23.350</b>	<b>24.274</b>	<b>23.229</b>

izelge 2.1.2 Meyve suyuna işlenen meyve ve sebze miktarları (bin ton).

MEYVE	2006	2007	2008	2009	2010
<b>VIŐNE</b>	52,2	72,6	54,6	49,7	73,5
<b>KAYISI</b>	36,1	38,2	74,9	41,9	36,5
<b>ŐEFTALİ</b>	65,3	90,1	118,8	80,2	95
<b>ELMA</b>	282,9	356,8	333,8	307,9	376,1
<b>PORTAKAL</b>	37,8	53,3	63,9	53,5	53,8
<b>NAR</b>	46,6	57,5	49,5	57,1	78,7
<b>HAVU</b>		30,6	30,7	12,3	24,6
<i>SİYAH HAVU</i>				9	23
<i>SARI HAVU</i>				3,3	1,6
<b>ZM</b>	8,4	18,3	16,9	18,7	17,2
<b>İLEK</b>		4,1	7,7	5,5	6,1
<b>GREYFURT</b>			5,5	0,8	0,4
<b>AYVA</b>	-	7,5	4,5	4,4	10,4
<b>DOMATES</b>	4,9	3,9	4,4	4,5	5
<b>KARADUT</b>				1	1,1
<b>ARMUT</b>				3,2	2,4
<b>CRANBERRY</b>				1	1
<b>LİMON</b>				11,7	40
<b>DİĞER</b>	47,9	4,3	3,2	5,1	1,2
<b>TOPLAM</b>	<b>582,1</b>	<b>737,2</b>	<b>771,1</b>	<b>658,4</b>	<b>824,8</b>

### 2.1.1. Kara havuçta bulunan fenolik bileşikler

Türkiye’de yetiştirilen kara havuçlarda temel çözüner şekerler olarak glikoz (1.10-5.60 g/100g), fruktoz, (1.0-4.36 g/100g) ve sukroz (1.20-3.31 g/100g) bulunmaktadır (Kammerer et al., 2004; Erten ve Tangüler, 2010). Öte yandan, kara havuçta 142.3-159.6 g/kg arasında kuru madde, 7.0-13.8 g/kg arasında protein, mineral maddelerden ise demir (4-5 mg/kg), potasyum (1790-2220 mg/kg), fosfor (252-310 mg/kg), kalsiyum (478-650 mg/kg) ve sodyum (298-447 mg/kg) bulunmaktadır. Ancak, havulardaki bu maddelerin bileşimi havucun çeşidine ve üretim koşullarına göre değişmektedir (Deryaoğlu, 1990; Tangüler, 2010).

Alasaver ve ark. (2001) turuncu, mor, sarı ve beyaz havuçlarda 11 farklı fenolik asit tanımlamışlardır ve fenolik asitlerin toplam konsantrasyonlarının en fazla kara havuçta bulunduğunu belirtmişlerdir (Alasalvar et al., 2001; Leja et al., 2013).

Literatürdeki kaynaklarda kara havucun antosiyanin içeriği ile ilgili çok farklı miktarlar söz konusudur. Literatürde turuncu ve kara havuçların antosiyanin içeriğinin 0 ile 350 mg/100g yaş ağırlık arasında olduğu bildirilmiştir (Arscott and Tanumihardjo, 2010). Lazcano et al. (2001), kara havuçların antosiyanin içeriğini 38-98 mg/100 g (yaş ağırlık) olarak belirtmişlerdir. Kammerer et al. (2004) ise daha yüksek (208-243 mg/100 g (yaş ağırlık)) oranda antosiyanin içeriği belirtmişlerdir. Mazza ve Miniati’nin (1993) yaptığı çalışmaya göre kara havuçta bulunan antosiyanin miktarı 1750 mg/kg (yaş ağırlık) olarak bulunmuştur.

Literatürde kara havuçların antosiyanin içeriğinin farklılık göstermesi kullanılan farklı ekstraksiyon tekniklerinden ve analitik metotlardan kaynaklanmaktadır. Örneğin başka bir kaynakta da kara havuç için 100-243 mg/100 g (yaş ağırlık), turuncu havuçlar içinse 16-71 mg/100 g (yaş ağırlık) antosiyanin içeriği belirtilmiştir (Leja et al., 2013).

Kara havuç köklerinde antosiyaninlerin yanı sıra, yüksek miktarlarda sinnamik asit türevleri (fenilpropanoidler) ve flavonoller de bulunmaktadır (Leja et al., 2013). Bunlara ek olarak önemli miktarlarda kafeik asit ve hidroksisinnamatları da içeren (klorojenik asit ve neoklorojenik asit) fenolik asitler de bulunmaktadır (Kammerer et al., 2004a).

Kara havuçlarda klorojenik ve kafeik asidin baskın olduğu en az 40 fenolik asit varlığı belirlenmiştir. Ayrıca, falkarindiol, falkarindiol 3-asetat ve falkarinol gibi poliasetilen bileşikleri de içerirler (Christensen and Kreutzmann, 2007; Poudyal et al., 2010).

Kara havuçlar da turuncu havuçlar gibi karoten içermektedirler, ancak bu bileşiklerin oranı turuncu havuçlara göre daha dştktir. Beyaz merkezli kara havuçlar çok dşk miktarlarda karoten (4-6 ppm) içermekteyken, mor-turuncu havuçlar daha fazla miktarlarda (38-130 ppm) karoten içermektedirler (Grassmann et al., 2007). Klorojenik asit tüm havuç çeşitlerinde yaygın bulunan bir bileşiktir ve konsantrasyonu kara, turuncu, beyaz ve sarı havuçlar için sırasıyla 54.1, 8.5, 4.5, and 4.4 mg/100 g' dır (Arscott and Tanumihardjo, 2010).

### **2.1.2. Kara havucun kullanım alanları**

Kara havuç çok eski zamanlarda en iyi havuç olarak bilinirken daha sonraları yemeklere renklerini vermelerinden dolayı bu önemlerini kaybetmişlerdir. Ancak günümüzde yapılan araştırmalar sonucu sağlık üzerine olumlu birçok etkilerinin bulunduğunun ortaya çıkarılmasıyla kaybettikleri bu değeri geri kazanmaya başladılar.

Kara havuç, ülkemizde sıklıkla kullanılan şalgam adı verilen fermente ieeğin ana maddelerinden birisidir. Hindistanda da şalgama benzer bir fermente içecek olan 'kanji' kara havuçtan üretilmektedir (Turker vd., 2004).

Kara havucun yemeklerde ve salatalarda kullanımı sınırlıdır. Son zamanlarda, diğer meyvelerle birlikte (nar vb.) meyve sularında kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca nl bir markanın ürettiği siyah havuç sirkesi de bulunmaktadır.

Antosiyaninler doğal boyar maddeler olarak kullanıldıkları için kara havuçlardan da bu bağlamda yararlanılabilir. Meyve suları ve nektarlarda, konservelerde, jlelerde ve şekerleme endüstrisinde kullanımı iyi bir alternatif olacaktır (Downham and Collins, 2000).

Doğal bir boyar madde olarak, kara havuç için gıda etiketinde E-numarasıyla herhangi bir beyanname gerekmemektedir (Khandare et al., 2011).



### 2.1.3. Kara havucun terapötik özellikleri

Kara havucun terapötik özellikleri yüksek miktarda içerdiği antosiyaninlerden kaynaklanmaktadır.

Renklendirici özelliklerine ek olarak, antosiyaninlere olan ilgi sağlığa olumlu etkileri sayesinde artmıştır. Bu etkiler arasında, damar tıkanıklığı riskini azaltması, kanseri önleyici etkileri, diyabet ve nörodejeneratif bozukluklara olumlu etkilerinin olması sayılabilir (Wrolstad, 2004).

Kara havuçların, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri de bulunmaktadır. Kılcal damar çatlakları nedeniyle oluşan kan dolaşımı bozukluklarının tedavisinde, trombosit agregasyonunun önlenmesinde, damar geçirgenliğinin korunmasında, diyabetin kontrolünde etkilidirler (Liu et al., 2008).

Açılınmış antosiyaninler daha stabil olmalarının yanında artırılmış biyolojik aktivitelere de sahiptirler. Örneğin; tatlı patatesten bulunan antosiyaninler güçlü radikal süpürme etkisine, antitumöjenik aktiviteye ve kan basıncını düşüren etkilere sahiptirler (Suda et al., 2003; Igarashi, Kimura and Takenaka, 2000). Antosiyaninlerin *in vitro* koşullarda hiperglisemiye önleyici etkileri olduğu da bulunmuştur (Matsui et al., 2002; Netzel et al., 2007).

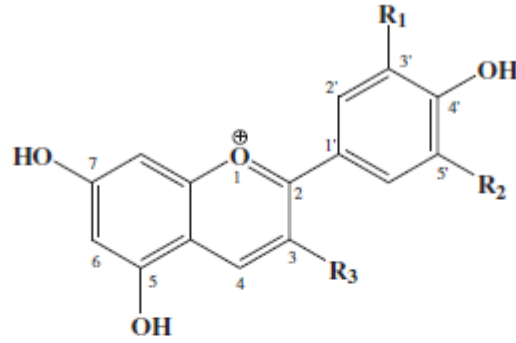
## 2.2. Antosiyaninler

Antosiyaninler, bitkilerde genellikle kırmızı, mor ve mavi renklerden sorumlu, gıda, nutrasötik (hastalıkları önleyici ve tedavi edici özelliği olan gıda) ve farmasötik uygulamalar için kullanımı mümkün olan yüksek oranda renkli pigmentlerdir (Doughall et al., 1998; Ersus ve Yurdagel, 2007).

Antosiyanidin bileşikleri glikozid formlarında (bir şekerle bağlı halde) buldukları zaman antosiyanin olarak adlandırılırlar.

Antosiyaninler, flavonoid olarak adlandırılan fenolik bileşiklerin geniş bir sınıfını oluşturmaktadır. 6 adet antosiyanidin çeşidi yüksek bitkilerde yaygındır, bunlar; pelargonidin (pg), peonidin (pn), siyanidin (cy), malvidin (mv), petunidin (pt) ve delfinidindir (dp). Cy, dp ve pg ise doğada en yaygın bulunan metillenmemiş antosiyanidinlerdir ve %80 i yapraklarda, %69 u meyvelerde ve % 50 si çiçeklerde bulunmaktadır. Ayrıca bitkilerin yenilebilir kısımlarındaki en yaygın bu 6 adet antosiyanidin dağılımı şu şekildedir; siyanidin (%50), pelargonidin (%12), peonidin (%12), delfinidin (%12), petunidin (%7), malvidin

(%7). Doğada bulunan en yaygın antosiyanin çeşidi ise siyanidin-3-glukozittir (Kong et al., 2003).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Delphinidin	-OH	-OH	-OH
Luteolinidin	-OH	-H	-H
Cyanidin	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH
Pelargonidin	-H	-H	-OH
Peonidin	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
Malvidin	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH

Şekil 2.2.1. Temel antosiyanin bileşiklerinin yapıları (Li et al., 2012).

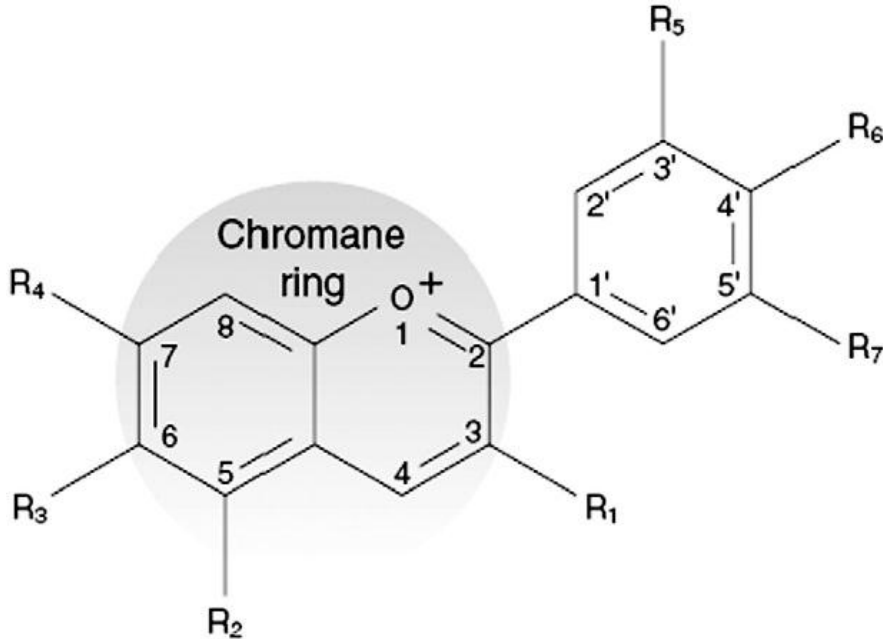
Doğada en sık bulunan bu 6 antosiyanin molekülünden başka 539 adet antosiyanin türü izole edilmiştir (Andersen and Jordheim, 2006).

Antosiyanin moleküllerinin bu kadar çeşitli olmasını sağlayan asıl etkenler; hidroksil grubu sayılarının farklılığı, yapılarındaki şeker moleküllerinin niteliği ve sayısı, yapının şeker molekülüne bağlanma pozisyonu, ve moleküldeki şekere bağlı alifatik ve aromatik asitlerin niteliği ve sayısıdır (Kong et al., 2003).

Antosiyaninler bakımından zengin olan meyve ve sebzeler arasında; kara havuçlar, mor mısırlar, dutsu meyveler (berries), kırmızı turp ve kırmızı lahana bulunmaktadır ve bu bitkiler antosiyaninler ile ilgili araştırmalar için sıklıkla bilimsel olarak kullanılmaktadırlar.

Antosiyanin molekülündeki hidroksil grubu (-OH) sayısı arttıkça renk maviye doğru dönmekte, metoksil grubu (-OCH<sub>3</sub>) sayısındaki artış ise rengin kırmızıya dönmelerini sağlamaktadır (Canbas, 1983). Asidik pH larda antosiyanin molekülünün renk kaybı fazla olmaktadır. Antosiyaninler asit ortamda kırmızı

renkli flavilyum katyonu halindeyken (Şekil 2.2.2), nötr ve bazik ortamlarda mavi renkli bileşikler haline dönüşmektedir (Ribéreau-Gayon and Glories, 2006).



Şekil 2.2.2. Flavilyum katyonunun temel yapısı (Cavalcanti et al., 2011).

Antosiyaninler sentetik boyalara karşı doğal alternatifler olarak kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte sağlığa faydalı birçok etkileri de bulunmaktadır (Bkz. Bölüm 2.1.3).

Antosiyaninler suda çözünebilen polar bileşiklerdir. Işık, pH, sıcaklık, sülfid, askorbik asit, enzimler gibi birçok çevresel faktörden etkilenebilen oldukça hassas moleküllerdir (Wesche-Ebeling and Argaiz-Jamet, 2002).

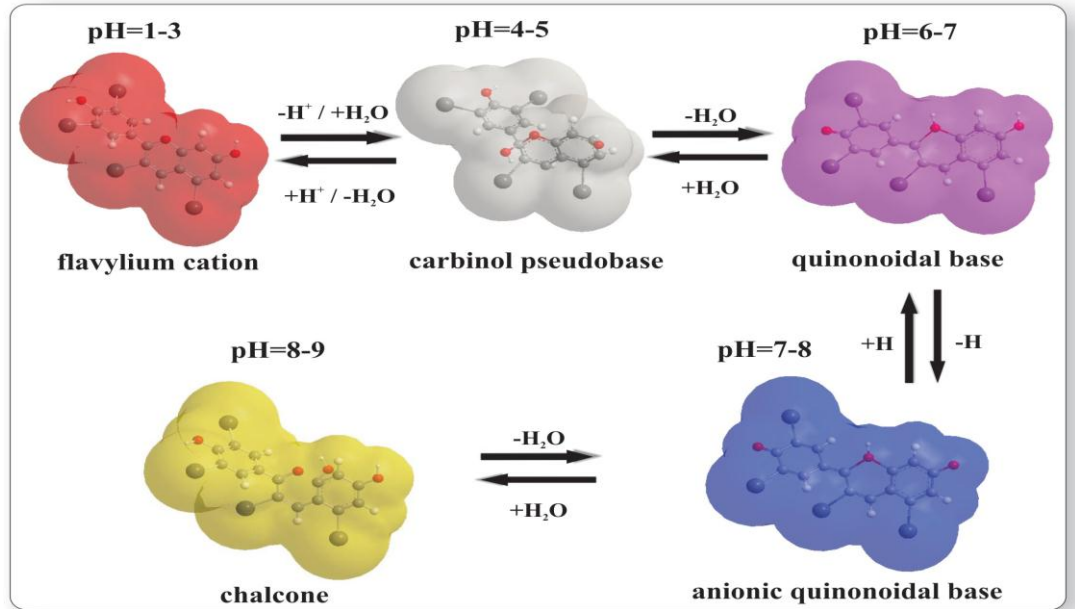
### 2.2.1. Antosiyaninlerin stabilitesi

İzole edilen antosiyaninler çok kararsızdır ve bozunmaya karşı oldukça duyarlıdır (Giusti and Wrolstad, 2003). Antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen faktörler arasında; antosiyanin moleküllerinin yapısı ve konsantrasyonları, pH, sıcaklık, ışık, ortamda kopigmentlerin bulunması, metal iyonları, enzimler, oksijen, askorbik asit, şeker ve parçalanmış şeker üniteleri, protein ve sülfür dioksit bulunmaktadır (Francis, 1989; Mazza and Miniati, 1993; Rodriguez-Saona et al., 1999).

Açılmiş antosiyaninler açılmemiş olanlara göre daha dayanıklıdır. Çünkü açıl kısımları onları su moleküllerinin hidrofilik saldırılarından korur

(moleküller arası etki). Böylece bu antosiyaninler diğerlerine göre daha yüksek ısı ve ışığa karşı dayanıklı ve uzatılmış raf ömrüne sahip olurlar (Netzel et al., 2007).

Antosiyaninler içinde buldukları çözeltinin pH'ına bağlı olarak farklı kimyasal yapılarda olabilirler. pH 1.0'de flavilyum katyonu (kırmızı renkten sorumlu) baskın bulunan türdür. Mor ve kırmızı renge katkı sağlar. pH 2.0 ve pH 4.0 aralığında mavi renk baskındır. pH 5.0 ve pH 6.0 aralığında ise sadece 2 adet renksiz tür gözlenebilir. Bunlar; karbinol yalancı bazı ve kalkondur. 7'den yüksek pH değerlerinde antosiyaninler hidrojen atomu yerine geçen grupların özelliğine de bağlı olarak bozulmaya başlar (Şekil 2.2.1.1) (da Costa et al., 1998; Fleschhut et al., 2006; Heredia et al., 1998; Kennedy and Waterhouse, 2000; Castañeda-Ovando et al., 2009).



Şekil 2.2.1.1. Sulu ortamda, farklı pH değerlerindeki antosiyaninlerin yapısal transformasyonları (Ananga et al., <http://dx.doi.org/10.5772/54592>).

Antosiyaninlerin stabilitesi B halkasındaki hidrojen atomlarının yerine geçen gruplardan etkilenir. Ayrıca yapıda ek olarak hidroksil ve metoksil gruplarının bulunması da antosiyanin stabilitesini etkilemektedir. Çünkü bu gruplar nötral ortamda aglikon stabilitesini düşürmektedir. Bu nedenle pelargonidin en dayanıklı antosiyanidin türüdür (Fleschhut et al., 2006).

Hidroksillenme derecesi antosiyaninlerin stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yapıdaki hidroksil gruplarının sayısının artması stabilitenin

azalmasına neden olmaktadır. Yüksek metoksil varlığı ise antosiyanin stabilitesinin artmasını sağlar (Francis, 1989; Cavalcanti et al., 2011).

Antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen bir diğer etken ışıktır. Işık antosiyaninlerin stabilitesini iki farklı yoldan etkilemektedir. Işık antosiyaninlerin biosentezi için gerekliyken, onların degradasyonunu da hızlandırmaktadır. (Markakis, 1982). Antosiyaninler karanlıkta saklandıkları zaman renklerini daha iyi korurlar. Karşılaştırmalı olarak, oda sıcaklığında aynı anda bir grup antosiyaninin aydınlıkta ve bir kısmının da karanlıkta bekletilmesiyle stabilitedeki fark sadece 24 saat içerisinde belli olmaktadır. (Kearsley and Rodriguez, 1981; Cavalcanti et al., 2011).

Yüksek sıcaklık ve güneş ışığı pigmentlerin kaybına neden olmaktadır. Antosiyaninler stabilitelelerini en iyi karanlık ve serin ortamlarda korudukları için bu şekilde saklanmalıdırlar. Antosiyaninlerin degradasyonu saklama sıcaklığıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Ayrıca, pigmentlerin kısa süreli 65 °C-90 °C arası yüksek sıcaklıklara maruz kalmasıyla pigmentlerin renginin yarı ömrü sadece birkaç saat içerisinde azalmaktadır. Antosiyanin molekülleri birkaç hafta boyunca 2-4 °C arası sıcaklıklarda başarılı bir şekilde depolanabilirler (Welch et al., 2008).

Bazı enzimlerin inaktive olması da antosiyaninlerin dayanıklılığını arttırmaktadır (Garcia- Palazon et al., 2004). En yaygın antosiyanin degrede edici enzimler glikozidazlardır. Glikozidazlar, antosiyanin pigmentinin glikozil ve aglikon kısımları arasındaki kovalent bağı kırar, ve bu reaksiyon yüksek oranda kararsız antosiyanidin degradasyonuyla sonuçlanır (Huang, 1956). Meyvelerde doğal olarak bulunan fenol oksidaz, polifenol oksidazlar gibi fenolazlar ve peroksidazlar da yaygın olan diğer antosiyanin degrede edici enzimler arasındadırlar (Kader et al., 1997; Pifferi and Cultrera, 1974; Cavalcanti et al., 2011).

Kara havuçlarda bulunan antosiyanin pigmentleri p-kumarik, ferulik, p-hidroksibenzoik ve sinapik asitlerle asetillenmiştir. Bu nedenle, hidrasyona, ışık ve pH etkilerine karşı daha dirençlidir. Kara havuçların bu yapısal özelliği üzüm posası gibi daha düşük oranlarda açillenme gösteren diğer ekstrelerle kıyaslandığında gelişmiş bir stabilite sağlar (Kammerer et al., 2004; Khandare et al., 2011).

### 2.2.2. Antosiyaninlerin antioksidan özellikleri

Serbest radikaller normal hücreleri okside ederek eksik elektron ihtiyacını karşılama eğilimindedirler. Bu olay sonucunda radikaller elektron alırken, hücreler oksidatif hasara uğramaktadır. Antosiyaninler okside edilmesi kolay olan bileşiklerdir, bu nedenle serbest radikaller için gerekli elektronu sağlayarak çevredeki hücreleri oksidasyona uğramaktan korurlar.

Antosiyaninlerin *in vitro* koşullardaki antioksidan etkileri kolon, endotel, karaciğer, meme ve lösemi hücre hatları ve keratinositler kullanılarak gösterilmiştir. Bu hücre kültürü sistemlerinde antosiyaninler, doğrudan reaktif oksijen türlerini süpürme etkisi, hücrelerin oksijen-radikal absorblama kapasitelerinin arttırılması etkisi ve faz 2 detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunun uyarılması etkisini göstermişlerdir. Ayrıca DNA' daki oksidatif bileşiklerin oluşumunun azaltılması, lipid peroksidasyonunun azaltılması, çevresel toksinler ve karsinogenler tarafından tetiklenen mutasyonun inhibe edilmesi ve sinyal iletim yollarını değiştirerek hücre çoğalmasının azaltılması üzerine anti-toksik ve anti-karsinogenik etkiler göstermişlerdir (Wang and Stoner, 2008).

Antosiyaninlerin radikal süpürme aktiviteleri (antioksidan etki) büyük oranda molekülün C halkasının 3. pozisyonundaki ve ayrıca B halkasının 3', 4' ve 5'. pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının varlığından ileri gelmektedir (Wang and Stoner, 2008).

Toplam antioksidan kapasitesini belirlemeye dayalı yöntemler iki başlık altında toplanır: elektron aktarımına dayalı ve hidrojen atomu aktarımına dayalı toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri. Elektron aktarımına dayalı yöntemler; CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite) / ABTS Yöntemi, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi ve DPPH Yöntemidir. Hidrojen atomu aktarımına dayalı yöntemlerin bazıları; TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre) Yöntemi, Luminol Yöntemi ve ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity; Oksijen Radikal Absorplama Kapasitesi) Yöntemidir.

DPPH kararlı bir radikaldır. Antioksidan maddelerin radikal süpürme kapasitelerinin belirlenmesinde ve ayrıca radikal-antioksidan reaksiyonlarındaki kinetik ve termodinamik özelliklerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Yu et al., 2002).

Gajewski et al. (2007) *in vitro* çalışmalarda metanolla ekstrakte edilmiş kara havuçların turuncu ve sarı havuçlara göre daha yüksek antioksidan etki gösterdiklerini belirtmişlerdir (Gajewski et al., 2007; Arscott and Tanumihardjo, 2010).

Li et al. (2011) yaptıkları çalışmada 12 adet yüksek oranda pigment içeren (kırmızı veya mor renkte) sebzenin (havuç, lahana, karnabahar, patates, soğan, kuşkonmaz ve patlıcan) antioksidan aktivitelerini üç farklı yöntemle (DPPH, FRAP ve ORAC) belirlemişlerdir. Örneklerin radikal süpürme aktiviteleri % 54.91 - 81.94 arasında değişirken, FRAP analizinde antioksidan aktiviteleri 10.00 - 70.07  $\mu\text{mol AAE/g DW}$  aralığındadır. ORAC analizinde ise daha geniş bir antioksidan aktivite aralığı elde edilmiştir (3.74 - 189.32  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ). En yüksek ORAC değeri mor patates Majesty türünden elde edilirken onu mor lahana izlemektedir. DPPH ve FRAP analizlerinde ise en yüksek değerler mor karnabahar ve lahanadan elde edilirken, 2. sırada kara havuç bulunmaktadır (Li et al., 2012).

Kaur and Kapoor (2002) yaptıkları çalışmada, kara havucun sulu ve etanollü ekstratlarından elde ettikleri antosiyaninlerin antioksidan aktivitesini  $\beta$ -karoten ağartma metoduna göre sırasıyla % 61.8 ve % 73.0 bulmuşlardır.

### **2.2.3. Antosiyaninlerin antikanser özellikleri**

Meyveler ve sebzelerden elde edilen antosiyaninler bakımından zengin ekstratlar ve saf antosiyaninler, *in vitro* koşullarda birçok kanserli hücre tipine karşı çoğalmayı önleyici etki göstermişlerdir. Antosiyaninler hücre döngüsü düzenleyici proteinlere (p53, p21, p27, cyclin D1, cyclin A vb.) etki ederek hücre döngüsünün çeşitli basamaklarını bloke eder ve böylece hücre proliferasyonu inhibe edilmiş olur. Antosiyaninler ise hücre çoğalmasının önlenmesinde antosiyaninlere göre daha etkilidirler (Zhang et al., 2005).

Yapılan çalışmalarda antosiyaninlerin normal ve kanserli hücreler üzerindeki çoğalmayı önleyici özellikleri karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlara

göre bunların seçici bir şekilde kanser hücrelerini hedef alırken sağlıklı hücreler üzerinde çok az veya hiç etkilerinin bulunmadığı saptanmıştır (Hakimuddin et al., 2004; Galvano et al., 2004). Ancak antosiyaninlerin kanserli ve sağlıklı hücre hatları arasındaki bu seçici etkisinin mekanizması henüz bilinmemektedir (Wang and Stoner, 2008).

Apoptoz, çeşitli hücre dışı lezyonlarla ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından önceden programlanan, hücre ölümünü kontrol eden bir mekanizmadır, hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilir. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü sağlıklı hücrelerin gelişmesinde ve büyümelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarken bu mekanizma kanserli hücrelerde bozulmuştur. Kimyasalların zararlı etkilerini önleyen etkenlerin (kemopreventif) bazıları malin hücrelerde apoptozun başlatıcılarıdır.

Antosiyaninler, antosiyanidinler ve antosiyaninler bakımından zengin ekstreler apoptozu ya hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (extrinsic pathway) ya da öncelikle mitokondride gelişen bir dizi hücresel olaylarla (intrinsic pathway) başlatabilir (Reddivari et al., 2007; Chang et al., 2005).

Mitokondriyal seviyede gelişmiş olan doğal apoptotik yolak Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. Mitokondriyal yolda kanserli hücrelere antosiyanin uygulaması sonucu mitokondriyal membran potansiyelinde artış, sitokrom c açığa çıkışı ve kaspaz bağımlı anti- ve pro- apoptotik proteinlerin değişimi gerçekleşir.

Hücre yüzeyinde oluşan yolda, antosiyaninler FAS ve FASL (FAS ligandı) nın ekspresyonunu değiştirerek kanser hücrelerinde apoptozun başlamasını sağlarlar.

Ek olarak, kanserli hücrelere antosiyaninlerle yapılan uygulama ROS ve onu takip eden apoptozisin artışına neden olmuştur. Bu da antosiyaninlerce indüklenmiş apoptoz için ROS aracılıklı mitokondriyal kaspaz-bağımsız yolunun önemli olduğunu göstermektedir (Feng et al., 2007; Wang and Stoner, 2008).

Hou (2003), en yaygın altı antosiyanin çeşidi arasında (siyanidin, delfinidin, petunidin, malvidin ve pelargonidin) sadece siyanidin, delfinidin ve petunidinin insan kökenli lösemi hücre hattında (HL-60) apoptozu indüklediğini bildirmiştir.



Bu üç antosiyanin molekülünün antikanser aktivitelerinin yapılarındaki B halkasındaki orto-dihidroksi grubunun bulunmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Diyetle bu üç antosiyanin türünü içeren besinlerle beslenilmesinin kansere karşı sağlığı güçlendirici etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir. Siyanidin temelli pigment içeriği sayesinde kara havucun sağlığı destekleyici gıdaların geliştirilmesinde uygun bir aday olacağı düşünülmektedir (Netzel et al., 2007).

Glei et al. (2004) HT 29 klon 19A tümör hücreleri ile yaptıkları çalışmada kara havuç antosiyaninlerinin 45  $\mu\text{M}$ 'yi (siyanidin-3 glikozid eşdeğeri) aşan konsantrasyonlarda bu hücre hattına sitotoksik etkilerinin olduğunu bulmuşlardır. Celiktaş et al. (2013) kara havuç bitki doku kültürlerinden ekstrakte ettikleri antosiyaninlerin çeşitli kanser hücrelerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Neuro 2-A hücrelerinde sitotoksik dozun 6.25  $\mu\text{M}$  olduğu, MCF7 hücre hattında 31.37  $\mu\text{M}$  ve SK-BR-3 hücre hattında da 38.74  $\mu\text{M}$  olduğunu bulmuşlardır.

Jing et al. (2008) antosiyaninler bakımından zengin bitkileri kullanarak yaptıkları çalışmada HT-29 kolonik hücre hattının çoğalmasının % 50'sini inhibe eden konsantrasyonlar ( $\text{GI}_{50}$  değerleri) mor renkli mısır için 13.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , kiraz için 31.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , yaban mersini için 32.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve kara havuç için 68.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak bulunmuştur.

Netzel et al. (2007) tarafından yapılan diğer bir çalışmaya göre kara havucun antosiyanince zengin ekstresinin 0.0 - 2.0mg/mL derişim aralığında hem HT-29 kolon kanser hücre hattında hem de HL-60 lösemi hücre hattında hücrelerin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Görülen inhibisyon miktarları doza bağlıdır ve en yüksek antosiyanin konsantrasyonunda (2.0 mg/ml) hücre büyümesi % 80 gibi çok başarılı bir oranda inhibe edilmiştir.

### 2.3. Ekstraksiyon Metotları

Ekstraksiyon basamağı bitkilerden aktif maddelerin elde edilmesindeki en önemli basamaklardan birisidir. Ekstrakte edilecek maddelerin özelliklerine göre yöntemin optimizasyonu sağlanarak en uygun solventin seçimiyle inert kısmın uzaklaştırılıp istenen verimlilikte etken madde üretimi sağlamak başlıca amaçtır.

Daha etkili yöntemlerin elde edilmesi için solvent tüketimi azaltılmalı, ekstraksiyon süresi kısaltılmalı ve ekstraksiyon verimi artırılmalıdır. Çeşitli yeni ekstraksiyon metotları bitkilerden aktif bileşenleri en etkili şekilde ekstrakte etmek için bu özelliklerle sahip olacak şekilde geliştirilmeye devam etmektedir.

Ekstraksiyon verimliliğini arttırmak amacıyla klasik ekstraksiyon metotlarının yanında (solvent ekstraksiyonu) modern ekstraksiyon metotlarının (ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu vb.) kullanımı da yaygındır. Solvent ekstraksiyonu gibi klasik yöntemler uygulaması kolay, ucuz, geniş kullanıma sahip olmasının yanında hassas moleküllerin ekstraksiyonu için uygun olmaması, fazla solvent tüketiminin olması, ekstraksiyon verimliliğinin nispeten düşük olması ve ekstraksiyon sürelerinin diğer metotlara kıyasla uzun olması gibi dezavantajlara da sahiptir (Gupta et al., 2012). Bu nedenlerle modern metotların organik solvent tüketimini azaltması, otomasyona uygun olması, daha kısa ekstraksiyon sürelerine sahip olması, hassas örneklerle çalışırken degradasyonlarının en aza indirgenmesi ve örnek hazırlama maliyetindeki azalmalar onlara olan ilginin artmasına neden olmuştur (Büyüktuncel, 2012; Wan and Wong, 2000).

Antosiyanin pigmentleri polar moleküller oldukları için polar solventlerde çözünürler. Antosiyaninlerin bitkilerden ekstraksiyonu az miktarda hidroklorik asit veya formik asit içeren metanol kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Asidin kullanım amacı çözeltinin pH değerini düşürerek antosiyanin degradasyonunu önlemektir. Ancak bu ekstraksiyon solventinde evaporasyon aşaması sırasında metanol buharlaştırılırken hidroklorik ve formik asit konsantre hale geçer ve pigment degradasyonu gözlenir (Kong et al., 2003).

### **2.3.1. Solvent ekstraksiyonu (Klasik yöntem)**

Tüm ekstraksiyon metotları arasında en yaygın olarak kullanıma sahip olan yöntemdir. Bunun nedenleri arasında eski ve geleneksel bir metot olması, uygulamasının kolay olması gelmektedir.

Solvent ekstraksiyonunun diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında en büyük dezavantajları, uzun proses süreleri ve çok fazla oranlarda organik solvent kullanılmasıdır. Bu kadar fazla miktardaki solventin zararsız hale getirilmesi hem maddi hem de çevresel sorun oluşturmaktadır. Solvent ekstraksiyonunda örnekler genellikle solventin kaynama noktasında ekstrakte edilir ve proses süresi uzun olduğundan bu işlem ısıl stabilitesi düşük olan maddelerin bozunmasına neden olabilmektedir. Kullanılan solvent miktarı fazla olduğu için işlem sonrasındaki deriştirme basamağında zorluk yaşanır. Geleneksel Soxhlet cihazı, sürecin hızlanmasına yardımcı olan çalkalama sağlamaz. Ayrıca bu yöntemde solvent seçme kısıtı vardır ve otomasyona uygulaması zor bir sistemdir (de Castro and Priego-Capote, 2010; Castro and Garcia-Ayuso, 1998; Büyüktuncel, 2012).

Antosiyaninler polar moleküller oldukları için en yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon solventleri etanol, metanol, aseton ve bunların sulu karışımlarıdır (Kahkonen et al., 2001; Castañeda-Ovando et al., 2009).

Antosiyanin moleküllerini elde etmek için üzüm posası ile yapılan ekstraksiyonlarda metanol ile ekstraksiyon etanole göre % 20, suya göre % 73 daha etkili bulunmuştur. Ancak gıda sektöründe metanol toksik olduğu için etanol ile ekstraksiyon yapılması tercih edilmektedir (Metivier et al., 1980).

### **2.3.2. Ultrasonik ekstraksiyon**

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ultrasonik ses dalgalarını kullanarak seçilen frekans aralığında hücre zarının permeabilitesini arttıran ve kavitasyon gücünü kullanarak maddelerin ekstraksiyonunu yüksek verimlilikte gerçekleştiren modern bir ekstraksiyon tekniğidir.

Ultrasonik sistem ayrıca mekanik bir etki de sağlamaktadır. Bu sistemde, solventin doku içerisine penetrasyonu ve katı-sıvı ara yüzeyindeki temas alanı artar. Ve bunun bir sonucu olarak etken madde hızlı bir şekilde katıdan solvente doğru difuze olur (Rostagno et al., 2003).

Schinor et al. (2004) yaptıkları çalışmada, *Chresta spp.* bitkisinden saponinler, steroidler ve triterpenoidler gibi aktif bileşiklerin ekstraksiyonu için ultrasonik metodu kullanmışlardır. Buna göre, geleneksel yöntemlere göre ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminin kullanımıyla 3 kat daha hızlı bir ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonik ekstraksiyon sisteminin bilinen ancak nadir görülen bir dezavantajı, etken madde üzerindeki istenmeyen değişiklikler ve serbest radikallerin oluşumuna neden olan ultrasonik enerjinin (20 kHz den fazla) toksik etkisidir (Handa et al., 2008).

### 2.3.3. Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, klasik solvent ekstraksiyonuyla mikrodalga enerjisini birleştiren yeni bir ekstraksiyon tekniğidir. Örnekle temas halinde olan solvent mikrodalga enerjisiyle ısıtıldıktan sonra ilgilenilen bileşiklerin örneğin matriksinden solvente doğru ekstrakte olması prosesidir (Renoe, 1994). Bu yöntem kapalı ekstraksiyon kaplarında gerçekleştirildiği için sıcaklık kontrolü sağlanmaktadır, mikrodalga enerjisi kullanıldığından işlem süresi oldukça kısalmıştır, solvente maruz kalma miktarı azaltılmıştır ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir.

Solvent mikrodalgaları absorbladığında, solvent moleküllerinin kinetik enerjisi artar ve böylece etken maddeye difüzyon oranı da artar (Mandal et al., 2007).

Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Mikrodalga enerjisi molekülleri 2 mekanizmayla ısıtmaktadır; bunlardan biri iyonların iletimi, diğeri ise dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalga'nın direkt etkisidir.

Bu yöntemde solvent seçimi oldukça önemlidir. Seçilen solventlerde dikkat edilecek noktalar; solventin mikrodalga ışınmasını absorplaması, solvent-matriks etkileşimi ve analitin solventteki çözünürlüğüdür. Dipol momenti daha yüksek olan solventler mikrodalga ışınması ile daha hızlı ısınır. Örnek olarak, dipol momenti düşük olan hekzan (dipol moment<0.1) ısınmazken, dipol momenti 2.69 olan aseton çok çabuk ısınacaktır (Lopez-Avila, 1999; Büyüktuncel, 2012).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemleri iki çeşittir:

1. Kapalı kap sistemi (Şekil 2.3.3)
2. Açık kap sistemi

Kapalı sistemler ısı ve basınç kontrolü sağladığı için daha elverişlidir.



Şekil 2.3.3. Mikrodalga ekstraksiyon cihazı (kapalı kap sistemi)

Mikrodalga ekstraksiyon sistemleri başlıca dört kısımdan oluşur. Birinci kısım mikrodalgaların oluşumundan sorumlu 'magnetron' olarak da adlandırılan kısımdır. İkinci olarak da dalgaların yönlendirilmesinde rol oynayan, mikrodalgaların doğrudan kaynaktan mikrodalga kavitesine yayılmasından sorumlu kısım bulunmaktadır. Üçüncü bileşen örnek ve örneği tutan kısım ile birlikte bulunan uygulayıcı kısımdır. Dördüncü kısım ise sirkulatördür ve mikrodalgaların hareketini sadece ileri yönde düzenler (Tatke and Jaiswal, 2011).

Mikrodalga yönteminin kullanılması özel ekipman ihtiyacı, yüksek ilk yatırım maliyeti, dalgaların oluşumu için elektrik enerjisine ihtiyaç duyması, klasik yöntemlere göre yüksek işletme maliyetlerinin olması gibi nedenlerle olumsuz gibi görünse de sistem yüksek ekstraksiyon verimlerine kısa sürede ulaştığı için uzun vadede ekonomik bir yöntemdir.

## 2.4. Yüzey Yanıt Metodolojisi ve Optimizasyon Parametreleri

Yüzey yanıt metodolojisi proses optimizasyonu için etkili bir tekniktir. Bu yöntem diğer geleneksel empirik yöntemlerin aksine çeşitli deneysel faktörler arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesini sağlar. Bağımsız değişkenler arasındaki etkileşim bu yöntemle incelenmektedir (Lien et al., 2012).

Cevap yüzeyi yöntemi (Response Surface Methodology) için ilk olarak bir cevap değişkeni ve bunun üzerindeki etkilerini bulmak için bazı bağımsız değişkenler belirlenir. Bu bağımsız değişkenlerin kombinasyonları arasından cevap değişkenini maksimum (ya da minimum) yapan değerler bulunur. Bu program, cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi bulmak için bir dizi matematiksel ve istatistiksel teknikten yararlanır. Bu teknikler, bağımsız değişkenlerin ayrı ayrı ya da kombinasyonlar halinde cevap üzerindeki etkilerini araştırır (Bas ve Boyacı, 2007).

Antosiyaninlerin çeşitli bitkisel kaynaklardan en yüksek verimde elde edilebilmesi için sıklıkla solvent çeşidi, solvent konsantrasyonu, katı:sıvı oranı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi gibi değişkenler optimize edilmektedir.

## 2.5 Enkapsülasyon Teknikleri

Sürdürülebilir ilaç salımı ve etkisi için polimerik ilaç salım sistemlerine artan bir ilgi mevcuttur. Ayrıca bu sistemler düşük oral bioyararlanımı olan, düşük çözünürlüğü olan ve/veya düşük dissolüsyon oranlarına sahip ilaçlar için geliştirilmektedirler. Nanosüspansiyonlar, partikül boyutunu düşürerek sudaki çözünürlüğü düşük olan ilaçlar için dissolüsyon oranını ve oral yararlanımı arttıran, umut verici sistemlerdir (Lipinski, 2002; Kesisoglu et al., 2007).

Işık ve sıcaklık gibi birçok fiziksel etkiye oldukça duyarlı olan antosiyaninlerin kararlılığını ve aktivitelerini korumak, raf ömürlerini arttırmak için enkapsülasyon yöntemi uygulanabilir (Jackson and Lee, 1991). Enkapsülasyonun bu avantajlarının yanında içerisindeki maddenin daha etkili kullanımı için vücutta kontrollü salımı sağlaması da önemli bir özelliğidir.

Enkapsülasyon hızlı bir şekilde gelişme gösteren, yüksek oranda uzmanlaşılabilir ve maliyet olarak uygun olan bir teknolojidir. Kaplama için endüstriyel olarak birçok yöntem tanımlanmış olmasına rağmen antosiyaninlerin kaplanması üzerine sadece birkaç teknikle çalışılmıştır. Bu çalışmalardan bir

tanesi antosiyaninler için uygun ve ekonomik olan püskürtmeli kurutucu yöntemidir ve genellikle kaplama materyali olarak maltodekstrinler kullanılmaktadır (Cai and Corke, 2000). Alternatif olarak uygulanabilecek bir enkapsülasyon yöntemi ise süperkritik akışkan temelli yöntemler olup kaplama işlemi için ılımlı koşullar (işlem düşük sıcaklık yüksek basınçta gerçekleştirildiğinden ısıl bozunma riski yoktur) sağlamaktadır ve işlem sonucunda homojen mikroküreler oluşmaktadır (De Graaf et al., 2001). Antosiyaninlerin kararlılığını arttıracak tekniklerden bir diğeri de ultrasonik ses dalgalarının kullanımınıdır. Ultrasonik ses dalgaları yönteminin önemli bir avantajı ekstraksiyon gerçekleşirken aynı ortamda enkapsülasyonu da gerçekleştirebilme yeteneğidir (Vilkhu et al., 2008).

Enkapsülasyonda elde edilecek partiküllerin büyüklüğü uygulanacağı yer baz alınarak büyük önem taşımaktadır. Büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen nanopartiküller ilaç sistemleri tasarımında tercih edilmektedirler. Nanopartiküller çözülmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal partiküller olup doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan polimerik partiküler sistemlerden oluşmaktadırlar. Aktif madde taşıyıcı sistem olarak hazırlanan ve kullanılan polimerik nanopartiküller pek çok avantajı ile diğer kolloidal yapıları taşıyıcı sistemlerden ayrılmaktadır. Nanopartiküllerin ilacı kontrollü olarak salması, etki etmesi istenen bölgede toplanması, stabilite sorunlarının olmaması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, sterilize edilebilmesi istenmektedir (Gürsoy, 2002; Donbrow,1992).

Nanopartiküllerin daha küçük boyutları nedeniyle retikuloendotelial sistem hücrelerinden kaçabildikleri için kanda kalış süreleri uzun olur ve ince kapilere kadar derin dokulara penetre olabilirler. Vücutta çeşitli hücreler tarafından alınabilir ve bağ dokuya kadar penetrasyon gösterirler. Böylece, karaciğer, dalak, akciğer, lenf gibi birçok organa hedefleme yapılabilir (Garcia et al., 2005; Kaur et al., 2008).

Nanopartiküllerin polimerik yapıları, aktif maddenin hedeflendirilmesini, salımının kontrolünü ve sürdürülmesini sağlar. Hedeflenen bölgede enjeksiyonlarını takiben, günler hatta haftalar süren bir aktif madde salımına olanak verirler (Mohanraj and Chen, 2006) ve biyolojik olarak parçalanabilme,

biyogeçimlilik, toksik olmama, mukoadeziflik gibi avantajlı biyolojik özelliklere sahiptirler (Garcia et al., 2005). Yüzey özelliklerinde ve parçacık boyutunda değişiklikler yapılabildiği için parenteral uygulama sonrasında pasif ve aktif ilaç hedeflendirilmesine olanak sağlamaktadırlar. Bunun sonucunda nanopartiküllerin makrofajlar tarafından tanınması da engellenmektedir. Bu şekilde nanopartiküllerin beyine ulaşabilirliği artırılmaktadır.

Nanoteknolojinin kanserde kullanımı, moleküler görüntüleme, moleküler tanı ve hedeflendirilmiş ilaç tedavisi için bilim, mühendislik ve tıptaki incelemelerin interdisipliner birleşimini kapsamaktadır. Monoklonal antikolar, peptidler ve küçük moleküller gibi tümöre hedeflendirilmiş ligandlarla bağlandığında, nanopartiküller tümör antijenlerine veya tümör damarlarına yüksek afinite ve spesifikle hedeflendirilmede kullanılabilir. Son yıllarda, moleküler ve hücrel görüntüleme için biyoafinite gösteren nanopartiküller, kanser tedavisi için ilaç taşıyan hedeflendirilmiş nanopartiküller ve erken kanser tanısı/görüntülenmesi için nanocihazlar ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir (Nie et al., 2007).

### **2.5.1. Antosiyaninlerin enkapsülasyonu**

Besinlerle alınan antosiyaninler düşük biyoyararlanıma sahiptirler, idrardaki geri kazanımları %0,004 – %0,1 aralığında değişmektedir (Manach et al., 2005; McGhie and Walton 2007). Çiğ ve pişmiş kara havuçlarla yapılan çalışmalar bu havuçlardaki antosiyaninlerin biyolojik olarak kullanılabilirliğini ve bütün olarak absorplanabilirliğini ancak bu işlemlerin düşük verimlilikte olduğunu göstermiştir (Kurilich et al., 2005; Charron et al., 2009). Siyanidin bazlı antosiyaninlerin absorpsiyon doygunluğu 250-350  $\mu\text{mol}$  (150-250 g havuca eşdeğer) miktarlarında alındığında gerçekleşmektedir. Ayrıca açılmemiş antosiyaninlerin plazma ve üredeki geri kazanım yüzdeleri açılmış olanlara göre daha yüksektir. Bu da asilasyonun biyoyararlanımı etkilediğini göstermektedir (Arscott and Tanumihardjo, 2010).

Antosiyaninlerin, kolon kanserini önleyici etkileri plazmadaki konsantrasyonlarından ziyade o bölgedeki yerel konsantrasyondan kaynaklanmaktadır. Çünkü antosiyaninlerin kolon epitel hücreleri tarafından doğrudan absorplandığı düşünülmektedir (Wang and Stoner, 2008; Wu et al.,



2006). Bütün haldeki antosiyaninlerin kalın bağırsağa iletiminin sağlanması midedeki ve ince bağırsaktaki hızlı emilimleri ve antosiyaninlerin bazik pH değerlerinde, oksijen ve ışık varlığında kararsız olması gibi sebepler nedeniyle zordur (Thomasset et al., 2009; Talavéra et al., 2005; He et al., 2009; Berg et al., 2012).

Antosiyaninler gibi hassas moleküllerin enkapsülasyonu hedef organa ulaşana kadar biyoaktivitelerini korumak için kullanışlı bir yöntem olabilir. Püskürtmeli kurutma yöntemi ile enkapsülasyon işleminin maddelerin biyolojik aktivitelerini sıcaklık, ışık, oksijen gibi çevresel faktörlerin dezavantajlarından ve insanların sindirim sistemi boyunca oluşan pH değerindeki değişimlerden koruduğu belirlenmiştir (Ré, 1998; Arshady, 1993; Gibbs et al., 1999; Ahrné et al., 2008; Berg et al., 2012).

Kara havuçtan elde edilen antosiyaninlerin enkapsülasyonu üzerine yapılan uygulamalar oldukça azdır. Ersus ve Yurdagel'in (2006) yaptıkları çalışmada kara havuçtan elde ettikleri antosiyanin ekstrelerini püskürtmeli kurutucu ile enkapsüle etmişlerdir. Kaplama materyali olarak üç farklı maltodekstrin kullanmış ve işlem sıcaklığı için en uygun değer 160 °C olduğu (180 °C ve 200 °C ye göre) bulunmuştur. Ayrıca farklı kaplamalar için en iyi antosiyanin içeriğine sahip olanları belirlemişlerdir. Çalışmanın diğer bir adımında ise 25 °C'de 64 gün boyunca depolanan parçacıklardaki antosiyanin içeriğinin %33 oranında 4 °C'de ise % 11 oranında azalma gösterdiğini belirtmişlerdir.

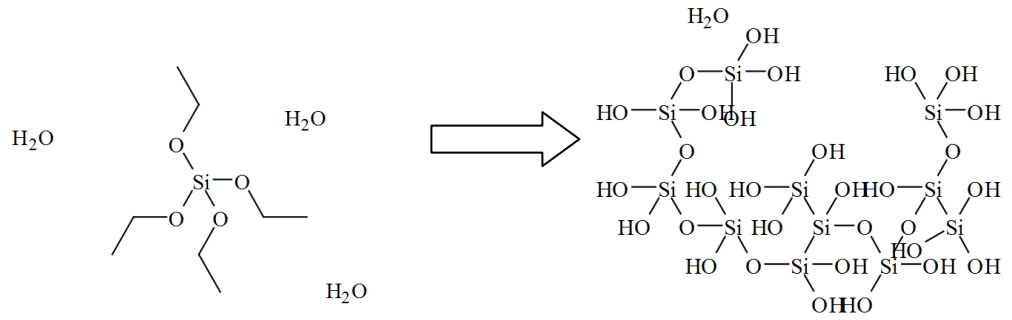
### **2.5.2. Sol-gel yöntemi**

Sol (bir çözeltideki katı parçacıklar); bir solventin içindeki kolloidal partiküllerin veya polimerlerin kararlı dağılımıdır. Partiküller amorf veya kristalin yapıda olabilirler. Jel; sıvı fazı çevreleyen üç boyutlu ağ yapısında ve porlu bir yapıdan oluşmaktadır. Solüsyondaki kolloidal partiküllerin bir araya toplanmasıyla jelin ağısı kolloidal yapısı oluşur. Polimer bir jelin içerisinde, partiküller alt-kolloidal partiküllerin kümeleşmesi sayesinde polimerik bir altyapıya sahip olurlar. Genel olarak, katı partiküller Van der Waals veya hidrojen bağları ile etkileşimdedirler. Ayrıca jel oluşumu polimer zincirlerinin birleşmesiyle de gerçekleşebilir. Materyal sentezi için kullanılan birçok jel sisteminde, kovalent bağlanma ve jel prosesi ilişkisi tersinmezdir. Sol-gel yöntemi

nükleer endüstrideki yeni sentez metodu ihtiyacını karşılamak üzere ilk olarak 1960 lı yıllarda geliştirilmiştir.

Silika matriksler içerisinde enkapsüle nanopartiküllerden oluşan nanokompozitler nanopartikül özelliklerinin ayarlanması ve stabiliteilerinin artırılması için esnek bir yol sağlarlar (Knecht and Wright, 2004).

Dendrimerik yapı sol-gel sisteminde porojen olarak kullanılır. Önceki çalışmalar PAMAM ve PPI dendrimerlerinin, diatomlardan izole edilmiş küçük gözenekli, silikayı çökeltten poliaminlerin biomimetik analogları olduğunu göstermiştir (Knecht and Wright, 2004). Buna ek olarak, PAMAM dendrimerleri, nanopartiküllerin sentezi sırasında konakçı olarak hizmet eder ve ortam koşullarında kondanse silika için bir kalıp görevi görmesiyle çok fonksiyonlu sistemler olarak kullanılır (Knecht and Wright, 2004).



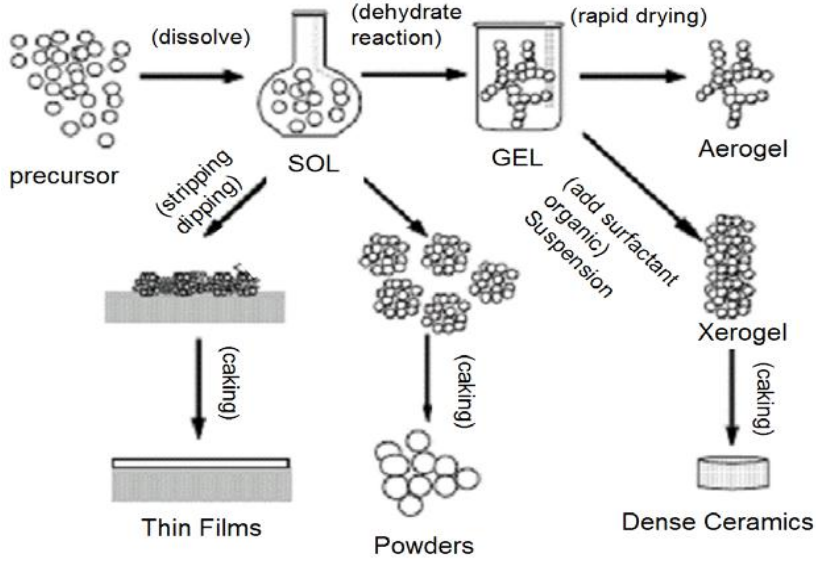
Şekil 2.5.2.1. Siloksan ağının oluşumu için kondenzasyon (Overney, 2010).

### Sol-Gel basamakları

Sol-gel prosesi birkaç adımdan oluşmaktadır, bunlar:

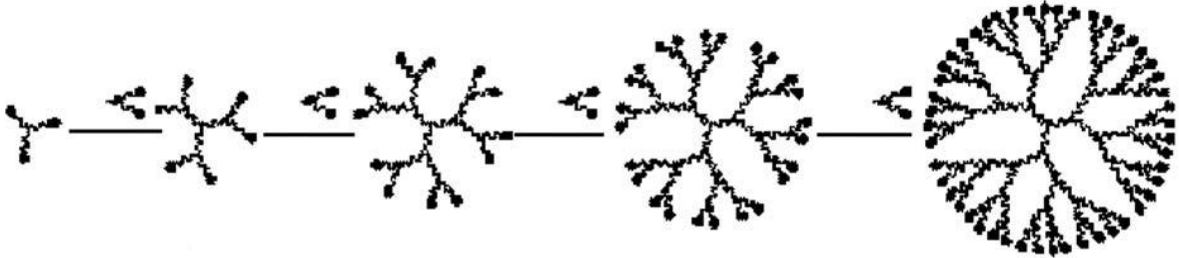
- Moleküllerin hidrolizi ve kondenzasyonu. Sol fazın oluşturulması (Şekil 2.5.2.1).
- Jelleşmenin gerçekleşmesi (sol-gel dönüşümünün gerçekleşmesi)
- Belirli bir süre jelin olgunlaştırılması (ageing)
- Kurutma

Sol-gel sprosesi, porlu yapılar, ince ağısı yapılar, yoğun tozlar ve ince filmler gibi birçok yapısal şekildeki materyallerin hazırlanması için kullanılabilir (Şekil 2.5.2.2).



Şekil 2.5.2.2. Sol-Gel basamakları (Overney, 2010).

Dendrimerler, nanoboyutta katmanlar halinde sentezlenen ve polimerik tekrar üniteleri içeren sentetik makromoleküllerdir. Dendrimerler, istenen yapı ve şekillerde kimyasal olarak sentezlenmektedirler. İstenen yapı ve işlevdeki dendrimer moleküllerinin sentezi bir çekirdek yapı üzerine eklenen dallar ve bu dallara son grupların ilave edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.5.2.3). Bu şekilde, bir dendrimer çekirdeğinden ardışık reaksiyonlar ile gerekli fiziksel ve kimyasal yüzey özelliklerini sağlayan son grupların eklenerek dallanmış dendrimerlerin oluşmasına lego kimyası adı da verilmektedir. Bu şekilde bir dendrimer makromolekülünün istenilen özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanması ve içerisine ilaç moleküllerinin yüklenmesi de sağlanabilir. (Svenson and Tomalia, 2005).



Şekil 2.5.2.3. Dallanmış dendrimer ünitelerinin oluşumu (lego kimyası) (Svenson and Tomalia, 2005).

PAMAM dendrimerleri 2003 yılında geliştirilmiştir. Bu dendrimerler hidrofilik ve hidrofobik özelliklerde hazırlanarak, ilaç salım sistemleri, özgül doku ve hücre tanıma bölgelerine sahip nanomakineler ve katalitik yapılar tasarlanabilir (Tomalia, Reyna, Svenson, 2007; Kocaefe, 2007).

### **2.5.3. İyonik jelasyon ile enkapsülasyon**

Nanopartiküllerin üretimi için birçok metot içerisinde iyonik jelasyon yöntemi uygulaması ve istenen partikül büyüklüğünde üretim yapılması için optimizasyonu kolay bir yöntemdir.

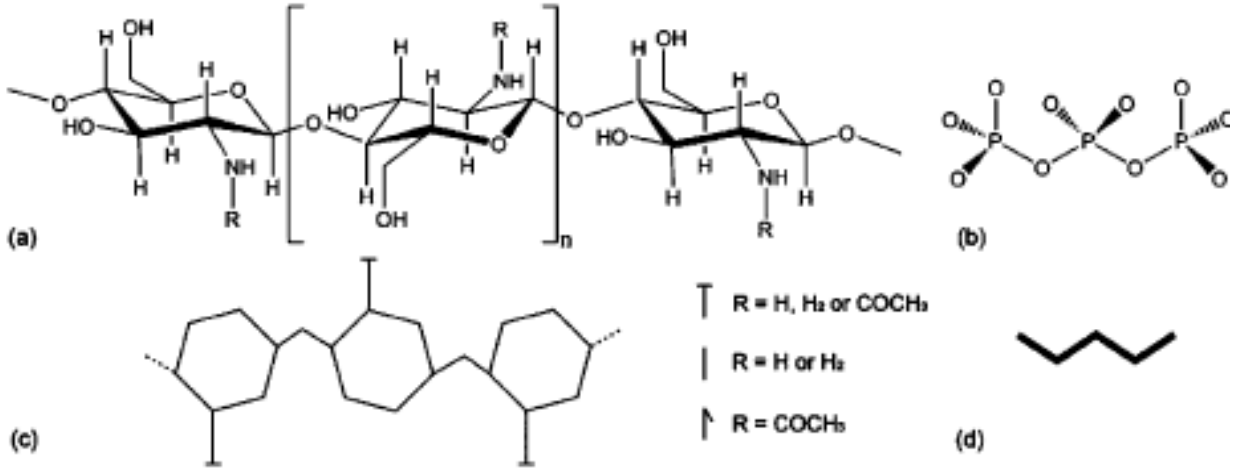
Emulsiyon-polimerizasyon ve solvent evaporasyonu gibi enkapsülasyon teknikleri birçok hazırlama adımı içeren, zaman ve enerji kaybına neden olan kompleks sistemlerdir. Suda çözünen polimerlerle enkapsülasyon işlemi sırasında organik solvent kullanılmaz, yüksek kayma gerilimlerine ihtiyaç duyulmaz ve bu yöntem diğer enkapsülasyon tekniklerine göre daha basit enkapsülasyon tekniği sunar (Kumar et al., 2011).

Suda çözünebilen polimerler arasında en yaygın olarak kullanılan polimer kitosandır. Bunun nedenleri; kitosanın doğal bir polimer olması, toksik olmaması, biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve ucuz olmasıdır (Nanda, Patil and Navathar, 2012).

Kitosanın ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan bir polimer olma nedenlerinden bir diğeri de, katyonik bir polimer olduğu için mukoadezif olması ve membran geçirgenliğini arttıran özelliklere sahip olmasıdır (Papadimitriou et al., 2008).

Bunların yanı sıra, katyonik bir polimer olan kitosan pozitif yüklenmiş bu grupları sayesinde arttırılmış absorpsiyon etkisine sahiptir. Bu özellikleri kitosanı ilaç salım sistemlerinde kullanılması için ilgi çeken bir polimer yapmaktadır (Kumar et al., 2011).

Kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Kimyasal yapısı, poli-[ $\beta$  (1,4)-2 amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz] şeklindedir (Şekil 2.5.3) (Gan and Wang, 2007).



Şekil 2.5.3. (a) Kitosanın moleküler yapısı (b) tripolifosfat polianyonunun moleküler yapısı (c) ve (d) sırasıyla bu moleküllerin basitleştirilmiş şematik gösterimi (Koukaras et al., 2012).

Hidrofilik bir polimer olan kitosanın amin grupları ile TPP (tripolifosfat) gibi poliaminlerin negatif grupları arasındaki elektrostatik etkileşim sonucunda nanopartikül oluşumu gerçekleşir (Bodmeier et al., 1989).

İyonik jelasyon ile enkapsülasyon yöntemi kitosanın TPP ile bir araya gelmesiyle oluşan çapraz bağlar ile jelleşmesine dayanır. Calvo et al. (1997) partiküllerin boyut ve yüzey yükünün kitosan ve dengeleyici fazın (örneğin TPP) oranını değiştirerek modifiye edilebileceğini belirtmişlerdir. Wu et al. (2005) nın yaptığı çalışmaya göre, nanopartiküllerin oluşumu kitosan ve TPP'nin özel ve ılımlı koşulları altında mümkündür.

## 2.6. Nanopartiküler Sistemler

Nanopartiküller, partikül büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen çözülmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan katı koloidal polimerik partiküler sistemlerdir. Aktif madde taşıyıcı sistem olarak hazırlanan ve kullanılan polimerik nanopartiküller pek çok avantajı ile diğer koloidal yapıları taşıyıcı sistemlerden ayrılmaktadır. Nanopartiküllerin; ilacı kontrollü olarak salması, etki etmesi istenen bölgede toplanması, stabilite sorunlarının olmaması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, sterilize edilebilmesi gibi özellikler aranmaktadır (Gürsoy, 2002; Donbrow, 1992).

Son yıllarda tıp ve biyoloji alanlarındaki yaygın kullanımı ile nanoteknolojiye olan ilgi artmıştır.

Farmasötik nanoteknoloji, terapötik olarak aktif bileşiklerin nanopartiküller, nanokapsüller, misel yapılar ve konjugatlar gibi biyouyumlu nano yapıların formülasyonunu geliştirmeye odaklanmıştır. Bu yapılar ilaç salım sistemleri olarak kullanıldığında, kontrollü ilaç salımının sağlanması, biyoyararlanımın artırılması, hedeflenen dokuda ilaç etkisinin uzatılması, kimyasal ve enzimatik bozulmaya karşı terapötik ajanın stabilitesinin artırılması ilaçların güvenliği ve etkinliğinin geliştirilmesinde birçok avantaja sahiptirler (Lubben et al., 2001).

Nano boyuttaki yapılar hücre membranı ve proteinlerle artırılmış bir etkileşime sahiptirler. Nanopartiküllerin boyutu ve yapısı onları biyomedikal cihazlara entegre olmasını kolaylaştırır (Mahapatro and Singh, 2011).

Son yıllarda nanomateryaller ile ilgili hızlı gelişmeler onların kardiyovasküler ve ortopedi gibi tıpın birçok alanındaki uygulamalarda kullanım alanı bulmasını sağlamıştır. Tıp alanında nanomateryaller doku iskelelerinin yapımında, ilaç dağıtım sistemlerinde, kanser tedavisinde, klinik biyolojik tanı koymada kullanılmaktadır (Liu et al., 2007; van Vlerken and Amiji, 2006; Vasir and Labhasetwar, 2007).

## **2.7. Beyin Kanseri Vakaları ve Neuro 2-A Hücre Hattı**

Kanser, yılda 7.6 milyon kişinin ölümüyle toplam ölümlerin % 13 ünü oluşturan dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Beyin kanseri bütün kanser vakalarının %1.9' unu oluşturur (Globocan 2008 Database). Günümüzde beyin kanseri vakaları için cerrahi yöntemlerle birlikte kemoterapi ve radyoterapi de uygulanmaktadır. Ancak beyin tümörü hücreleri için cerrahi müdahalenin zor olması ve tümör dokusunun büyük bir kısmı çıkarılsa bile bir miktarının kalması hastalığın yeniden ortaya çıkabilme riski taşıması nedeniyle alternatif çözümler aranmaktadır. Kan-beyin bariyeri de pek çok ilacın beyine ulaşmasına engel olmaktadır. Bunlardan bir tanesi istenen antikanser nanopartiküler sistemleri istenen miktarlarda doğrudan tümör dokusuna hedeflemektir. Bu nanopartiküler sistemler antineoplastik ilaçlarla tasarlandığı gibi doğal ürünlerle de tedavi şansı bulunmaktadır.

Beyin tümörleri primer ve metastatik olarak sıklıkla izlenen ve iyileşme şansının az olduğu bir hastalıktır. Yetişkinlerde sıklıkla gliom primer tümörü görülmektedir (Burnetti, et al., 1996).

Beyin tümörü, intrakraniyal solid neoplasm olarak veya beyin içinde veya santral spinal kanalda anormal ölçüde hücre çoğalmasına bağlı oluşan kitledir. Baş ağrısı, kusma(ileri düzeyde), sara nöbetlerine benzer seri bayılmalar, tümörün beyindeki yerine göre vücutta bazı kısımlarda felç, kişilik ve ruhsal bozukluklar, isim hatırlamama, hesap yapamama gibi sayısal ve sözel hafıza bozuklukları gibi belirtileri vardır (Laske et al., 1997).

## **2.8. Kan-Beyin Bariyeri**

Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin ve sistemik dolaşım arasında yapısal ve kimyasal bir bariyer oluşturan kan damarları ağından oluşur. Kan beyin bariyerinin damarları fenestrasyon (kan damarları ve dokular arasında hızlı bir şekilde molekül alışverişine olanak sağlayan porlar) özelliği olmayan özelleşmiş endotel hücrelerinden ve hücre geçirgenliğini sınırlayan sıkı bağlardan oluşur. Sınırlandırılmış geçirgenlik beyni iyonik ve metabolik şartların hızlı değişiminden ve beyine toksik maddelerin etkisinden korur. KBB nin geçirgenliği nöronlar, ekstraselüler matriks ve astrositler, perisitler, vaskular endotel hücreler gibi nöronal olmayan hücreler tarafından düzenlenir (rndsystems, 2014).

Kan ve beyin arasında birkaç tabaka mevcuttur. Bunlar; kapiler endotel hücreleri, tip IV kollajenden oluşan bazal membran, kapilleri tamamen kaplayan fibronektin ve laminin, bazal membrana gömülü halde bulunan perisitler ve bazal membranı çevreleyen astrositlerdir. Bu tabakaların her biri çözülmüş maddelerin hareketini kısıtlar (Hawkins et al., 2006).

P-glikoproteinleri, kanser hücrelerinde ilaçları hücreden dışarı atarak çoklu ilaç direncini sağlayan ATP enerjisi ile çalışan pompalardır. Bu proteinler beyin endotel hücrelerinde ifade edilirler ve KBB 'nden siklosporin A ve vinblastin gibi hidrofobik bileşikler endotel hücrelerinden kana geri pompalayarak bu bileşiklerin geçirgenliğini sınırlarlar. Beyin kapileri endotel hücreleri içerisindeki metabolik proses kan-beyin fonksiyonu için önemlidir. Kanda bulunan nörotransmitter maddelerin çoğu düşük lipid çözünürlükleri ve kapiler endotel hücrelerinin luminal membranında özel taşıyıcı proteinlerinin olmaması sebebiyle beyine giremezler (Neuroscience, 2014).

KBB aşmak için bir diğer yol da etken maddeyi taşıyan nanopartiküllerin kullanılmasıdır. Bu engeli geçmek için kullanılacak olan nanopartiküllerin

boyutları 100-400 nm arasında olmalıdır. Lipozomlarla karşılaştırıldığında 40-80 nm arası partikül büyüklüğündeki lipozomlar KBB'ni geçemezken partikül büyüklüğü daha fazla olan nanopartiküller geçebilmektedir. Nanopartikül formulasyonlarının kararlılığını sağlamak için polisorbat 80 gibi yüzey aktif maddeler kullanılabilir. Bu yüzey aktif maddeler KBB'nin açılmasını sağladıkları için KBB'nden nanopartikül geçişini arttırmaktadır (Çetin ve Çapan, 2004).



### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar Çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Satın Alındığı Firma
Cyanidin-3-glucosid	PhytoLab
Kitosan (düşük molekül ağırlıklı)	Sigma Aldrich
TPP(tripolifosfat)	Sigma Aldrich
HCl	Sigma Aldrich
Asetonitril	Merck
Folin reaktifi	Merck
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
DPPH radikali	Sigma Aldrich
Asetik asit	Merck % 100 (glacial)
RPMI 1640 besi ortamı	Sigma Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Etanol	Merck

### 3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasal aletler, cihazlar ve satın alındıkları firmalar Çizelge 3.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz Adı	Satın Alındığı Firma
Ultrasonik su banyosu	Everest Ultrasonic
Mikrodalga ekstraksiyon cihazı	Sineo Microwave Chemistry
Manyetik karıştırıcı	Ika RT 15
Spektrofotometre	Ultraspec 1100 pro Amersham Biosciences
Hassas terazi	Radwag AS 220/C/2
Soğutmalı santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 32 R
Çalkalayıcı karıştırıcı	Infors HT Labotron
Diyaliz torbası	Spectrumlabs
UPLC	Waters Instruments
Etüv	Elektro-mg M 420
pH metre	Hanna Instruments 2211
İnkübatör	Heracell
Malvern Zeta sizer	Malvern Instruments
DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)	Perkin Elmer DSC-8000
XRD (X-Işınları Kırınım Cihazı)	Phillips X'Pert Pro
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	Phillips XL-30S FEG

### 3.3. Ön İşlemler

Kara havuç bitkisi ülkemizin belirli bölgelerinde özellikle Konya'nın Ereğli ilçesinde bol miktarda üretilmektedir. Ön hazırlık aşaması için Bornova semt pazarından alınan yaklaşık 5 kg ağırlığındaki kara havuçlar, üzerindeki toprak ve tozdan arındırılması amacıyla ilk olarak bol miktarda şebeke suyuyla yıkanmış ve tepe kısımlarından yaklaşık 1 cm kesilerek kabuklarıyla birlikte küçük parçalara doğranmıştır.

Radyatör üzerinde kurutulduktan (radyatör sıcaklığı yaklaşık olarak 50 °C, havuçların sıcaklığı ise 40 °C olarak ölçülmüştür) sonra laboratuvar tipi parçalayıcı ile toz haline getirilmiş ve nem almayacak şekilde +4 °C'de saklanmıştır. Çalışmalarda geriye dönebilmek amacıyla ise bir miktar havuç bütün halde -24 °C' deki derin dondurucuda saklanmıştır.

### 3.4. Ekstraksiyon İşlemleri

Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon ve karşılaştırma amaçlı solvent ekstraksiyonu, çözücü olarak etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerin uygulanacağı ekstraksiyon basamağında daha yüksek verim elde etmek için sıcaklık, ekstraksiyon süresi, katı:sıvı oranı gibi parametreler optimize edilmiştir. Deneysel tasarım programında (design expert) yüzey yanıt metodolojisi yöntemi kullanılarak her ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen antosiyanin miktarı için optimizasyon işlemi gerçekleştirildi. Yüzey yanıt metodolojisi kullanılarak optimum antosiyanin içerikleri belirlendikten sonra her ekstraksiyon yöntemi için en yüksek antosiyanin içeriğinin elde edildiği koşullarda ekstraksiyon işlemleri solvent olarak su kullanılarak tekrar edildi.

#### 3.4.1. Solvent ekstraksiyonu

Ekstraksiyonu gerçekleştirilecek olan öğütülmüş kara havuçlardan deney desenine göre belirlenmiş olan bir miktar cam balona çözücü ile birlikte ilave edildi. Önceden belirlenen sürelerde ve sıcaklıkta ekstraksiyon işlemleri yürütüldü (Çizelge 3.4.1). Bu sistemde, sıcak çözücü buharı yoğunlaştırıcuya ilerler, yoğunlaşarak katı-sıvı karışımının üzerine düşer. Bu esnada katının içerdiği bir miktar antosiyanin solventte çözünmektedir. Ancak bu yöntemin yüksek miktarda çözücü kullanılması ve uzun proses süreleri gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Çizelge 3.4.1. Solvent ekstraksiyonu denemeleri

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Time h	Factor 3 C:Solid:Liquid r	Response 1 Anthocyanin mg/g extract
1	Block 1	30.00	4.00	25.00	
2	Block 1	30.00	2.00	15.00	
3	Block 1	40.00	2.00	5.00	
4	Block 1	30.00	4.00	5.00	
5	Block 1	40.00	6.00	5.00	
6	Block 1	40.00	6.00	25.00	
7	Block 1	30.00	6.00	15.00	
8	Block 1	40.00	4.00	15.00	
9	Block 1	40.00	4.00	15.00	
10	Block 1	40.00	4.00	15.00	
11	Block 1	50.00	2.00	15.00	
12	Block 1	50.00	4.00	5.00	
13	Block 1	40.00	2.00	25.00	
14	Block 1	50.00	4.00	25.00	
15	Block 1	50.00	6.00	15.00	

Karşılaştırma amaçlı kullanılacak bu yöntemle kara havuç ekstraksiyonu deneysel tasarım ile optimize edildi. Ekstraksiyon için bağımsız değişkenler, sıcaklık, katı:sıvı oranı ve ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Deneysel tasarım kapsamında seçilen parametreler için minimum maksimum değerler belirlenmiş olup oluşturulan farklı deney koşullarından oluşan deneme deseni Çizelge 3.4.1’de verilmektedir. Deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Yüzey Yanıt Metodolojisi ile değerlendirilmiştir.

15 run’ın ekstraksiyonu ilk etapta solvent olarak etanol kullanılarak gerçekleştirildi. Deney tasarım programına göre, en iyi antosiyanin veriminin elde edildiği koşullarda ekstraksiyon işlemi solvent olarak su kullanılarak tekrarlandı.

### 3.4.2. Ultrasonik ekstraksiyon

Bu yöntemle kara havuç ekstraksiyonu deneysel tasarım ile optimize edilmiştir. Ekstraksiyon için en verimli koşulların elde edilmesi amacı ile sıcaklık, katı:sıvı oranı ve ekstraksiyon süresi optimizasyon parametreleri olarak seçilmiştir. Deneysel tasarım kapsamında seçilen parametreler için minimum maksimum değerler belirlenmiş olup oluşturulan farklı deney koşullarından oluşan deneme deseni Çizelge 3.4.2’de verilmektedir. Deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Yüzey Yanıt Metodolojisi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4.2. Ultrasonik ekstraksiyon denemeleri

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Time min	Factor 3 C:Solid:Liquid r	Response 1 Anthocyanin mg/g extract
1	Block 1	40.00	20.00	5.00	
2	Block 1	40.00	100.00	25.00	
3	Block 1	40.00	60.00	15.00	
4	Block 1	50.00	60.00	25.00	
5	Block 1	40.00	60.00	15.00	
6	Block 1	30.00	60.00	25.00	
7	Block 1	40.00	60.00	15.00	
8	Block 1	40.00	20.00	25.00	
9	Block 1	30.00	60.00	5.00	
10	Block 1	30.00	100.00	15.00	
11	Block 1	50.00	60.00	5.00	
12	Block 1	30.00	20.00	15.00	
13	Block 1	40.00	100.00	5.00	
14	Block 1	50.00	20.00	15.00	
15	Block 1	50.00	100.00	15.00	

15 run'ın ekstraksiyonu ilk etapta solvent olarak etanol kullanılarak gerçekleştirildi. Deney tasarım programına göre, en iyi antosiyanin veriminin elde edildiği koşullarda ekstraksiyon işlemi solvent olarak su kullanılarak tekrarlandı.

### 3.4.3. Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon

Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon ile kara havuç prosesi deneysel tasarım ile optimize edilmiştir. Ekstraksiyon için bağımsız değişkenler, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve katı:sıvı oranı olarak belirlenmiştir. Mikrodalga gücü 500 W olarak belirlenmiştir. Deneysel tasarım kapsamında seçilen parametreler için minimum maksimum değerler belirlenmiş olup oluşturulan deneme deseni Çizelge 3.4.3'de verilmektedir. Deneyler sonunda elde edilen sonuçlar Yüzey Yanıt Metodolojisi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4.3. Mikrodalga yardımcı ekstraksiyon denemeleri

Run	Block	Factor 1 A:temperature C	Factor 2 B:time min	Factor 3 C:liquid:solid ra	Response 1 anthocyanin mg/g extract
1	Block 1	50.00	3.00	15.00	
2	Block 1	40.00	15.00	25.00	
3	Block 1	30.00	15.00	15.00	
4	Block 1	30.00	9.00	25.00	
5	Block 1	30.00	9.00	5.00	
6	Block 1	40.00	3.00	25.00	
7	Block 1	40.00	9.00	15.00	
8	Block 1	40.00	9.00	15.00	
9	Block 1	50.00	15.00	15.00	
10	Block 1	30.00	3.00	15.00	
11	Block 1	50.00	9.00	5.00	
12	Block 1	50.00	9.00	25.00	
13	Block 1	40.00	3.00	5.00	
14	Block 1	40.00	9.00	15.00	
15	Block 1	40.00	15.00	5.00	

15 run'ın ekstraksiyonu ilk etapta solvent olarak etanol kullanılarak gerçekleştirildi. Deney tasarım programına göre, en iyi antosiyanin veriminin elde edildiği koşullarda ekstraksiyon işlemi solvent olarak su kullanılarak tekrarlandı.

### 3.5. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi

Kara havuç ekstrelerindeki antosiyanin miktarı ilk olarak pH farklılığı yöntemi ile belirlenmiş, daha sonra doğrulama amaçlı UPLC ile analiz edilmiştir.

#### 3.5.1. pH farklılığı yöntemi

Ekstrakte edilmiş kara havuç örneklerindeki monomerik antosiyanin içeriği Guisti & Wrolstad ( 2001) tarafından tanımlanan 'pH farklılığı' metoduna göre hesaplanmıştır. Bu yöntem antosiyaninlerin farklı pH değerlerinde pigmentasyonlarının farklı olmasına dayanmaktadır. pH 1.0 değerinde antosiyaninler renklidir ve turuncudan mor ışığa kadar çeşitli renkleri iletebilirler. pH 4.5 değerinde ise bütün antosiyaninler renksizdir. Renklenmedeki bu değişiklik antosiyanin molekülünün C halkasındaki değişiklikten kaynaklanmaktadır. pH değerine bağlı renklenmedeki bu değişimler spektrofotometrik olarak ölçülebilir ve örneklerdeki antosiyanin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılabilir

Ekstrelerin pH değeri 0.1 M HCl (hidroklorik asit) ve 4.9 mM KCl (potasyum klorür) kullanılarak pH 1.00'e ve 24.8 mM sodyum asetat (NaAC) kullanılarak pH 4.5'a ayarlanmıştır (Ölçümler sırasında istenen pH ya ulaşmak

için gerekli seyreltmeler HCl kullanılarak gerçekleştirilmiştir). UV/visible spektrofotometre kullanılarak pH 1.00 ve pH 4.5 da her ekstrenin absorbansı 510 nm ve 700 nm de ölçülmüştür. Absorbans okumaları sırasında etanol kör olarak kullanılmıştır.

Monomerik antosiyanin içeriği aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (mg/l):

$$= \frac{A \times MW \times SF \times 1000}{\epsilon \times L}$$

$\Delta A$  = Absorbans farkı (uygulanan yöntemle göre pH 1.0 ve pH 4.5 değerlerinde ölçülen absorbans farkı) Absorbans farkı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\Delta A = ((A_{510} - A_{700})_{pH 1.0}) - ((A_{510} - A_{700})_{pH 4.5})$$

MW = Molekül ağırlığı

SF = Seyreltme faktörü

$\epsilon$  = Molar absorbans

L = Absorbans ölçüm kuvvetinin tabaka kalınlığı, cm

Toplam antosiyanin miktarı siyanidin-3-glikozid eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

### 3.5.2. UPLC analizi

Kromatografik analizler Ace C-18 150 mm  $\times$  4.0 mm  $\times$  5  $\mu$ m kolon (Advanced Chromatography Technologies Ltd, Aberdeen, Scotland) ve 2996 model PDA dedektörü (Waters Instruments, Inc., Milford, MA) ile donatılmış Alliance 2695 Separations Module kullanılarak gerçekleştirildi. Solvent sistemi olarak % 0.01 TFA içeren su (solvent A) ve % 0.01 TFA içeren asetonitril (solvent B) kullanıldı. Uygulanan UPLC yöntemi Çizelge 3.5.2.1 de gösterilmektedir. Analiz süresince, enjeksiyon hacmi 10  $\mu$ l, akış hızı 750  $\mu$ l /min ve dalga boyu 520 nm olarak seçildi.



Çizelge 3.5.2.1 Uygulanan UPLC yöntemi

Time min	A%	B%	Flow $\mu\text{l}/\text{min}$
0	95	5	750
4	95	5	750
10	85	15	750
23.5	75	25	750
25	70	30	750
25.01	5	95	750
28	5	95	750
28.01	95	5	750
30	95	5	750

Kalibrasyon eğrisi için, Cyanidine-3-o-glycoside standartı HPLC saflıktaki metanol içerisinde çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Bu stok solüsyonundan ardışık seyreltmeler yapılarak 6 noktadan geçen kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ( $200\text{--}3.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Çizelge 3.5.2.2 de kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrisi denklemi, kalibrasyon aralığı ve  $R^2$  değeri gösterilmektedir.

Çizelge 3.5.2.2. Cyanidine-3-o-glycoside standartı için elde edilen konsantrasyon aralığı, doğrusal kalibrasyon eğrisi denklemi ve  $R^2$  değeri

Bileşik	Konsantrasyon Aralığı $\mu\text{g mL}^{-1}$	Kalibrasyon eğrisi denklemi*	$R^2$
Cyanidine-3-o-glycoside	3,125-200	$y=3,95e004x - 2,29e005$	0,987

\*x: konsantrasyon ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y: alan

pH farklılığı yöntemine göre belirlenen antosiyanin miktarları yüzey yanıt metodolojisindeki programa yerleştirildiğinde elde edilen optimum koşullarda ekstraksiyonlar her yöntem için bir kez daha tekrarlandı. Her üç yöntemden elde edilen üç yeni ekstrenin antosiyanin miktarları karşılaştırma amaçlı hem pH farklılığı yöntemi kullanılarak hem de HPLC kullanılarak tayin edildi.

### 3.6. Toplam Fenol Miktarının Belirlenmesi

Örneklerin toplam fenol içeriği Slinkard ve Singleton (1999) tarafından geliştirilen Folin Ciocalteu Yöntemine göre belirlenmiştir. Ekstrelerde bulunan toplam fenolik maddeler Folin-Ciocalteu reaktifi ile renkli bir kompleks oluşturur ve 760 nm de maksimum absorbans verir. Aborbans değerleri genellikle hazırlanan gallik asit çözeltisinin absorbans değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanır.

Bu analiz için her ekstraksiyon yönteminden elde edilen en yüksek antosiyanin içeriğine sahip solvent olarak etanolun kullanıldığı 3 adet ekstre ve optimum koşullarda su ile tekrarlanan ekstraksiyon sonucu elde edilen 3 adet ekstre kullanıldı. Ekstrelerin son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde seyreltmeler yapıldı. Toplam fenol miktarının belirlenmesi için kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

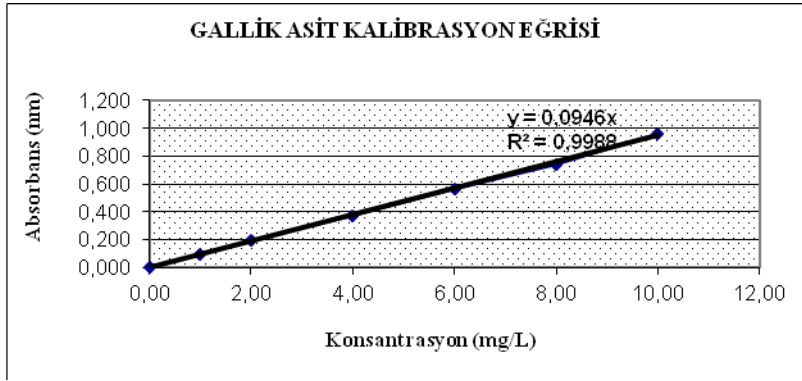
Çizelge 3.6. Fenol tayini için kullanılan kimyasallar ve miktarları

	Kontrol	Ekstre
Ekstre (mL)	-	0,10
Distile su (mL)	10,0	9,90
Folin Reaktifi (mL)	0,50	0,50
Örnekler vorteks ile karıştırılır ve 5 dk. beklenir.		
%20 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	1,5	1,5
760 nm de kontrol tüpüne karşı örneklerin absorbans değerleri okunur.		

Elde edilen absorbans değerleri (y) gallik asit eğrisinden elde edilen denklemde ( $y = x \times 0,0946$ ) yerine koyularak konsantrasyon (x) değerleri bulundu (Şekil 3.6). Bu denklemden elde edilen konsantrasyon değerleri (x) aşağıdaki eşitlikte yerine koyularak ekstrlerdeki toplam fenolik madde içeriği belirlendi.

$$\text{Toplam fenol konsantrasyonu (mg GAE / g ekstre)} = \frac{x \times (\text{seyreltme faktörü})}{\text{ekstre konsantrasyonu}}$$

Toplam fenolik içerik gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

### 3.7. DPPH Analizi

Optimum antosiyanin içeren ekstraksiyon koşullardaki 3 adet etanollü, 3 adet sulu ekstre kara havuç bitkisindeki DPPH radikal süpürme aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. DPPH yönteminde numuneler 517 nm de DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) radikali ile maksimum absorbans verirler. 1,97 mg DPPH radikali 5 mL etanolle çözülerek DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. Ekstrelerin son konsantrasyonu 25 µ/mL olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. 4 mL ekstre 0,5 mL DPPH çözeltisi eklenerek vorteks ile yaklaşık olarak 15 saniye karıştırılmıştır. Ayrıca DPPH radikali içinde bir kontrol hazırlandı. Bunun için aynı miktardaki DPPH çözeltisi 4 mL etanole eklenmiştir. Tüm örnekler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde bekletildi. 30 dakika sonunda örneklerin absorbansı etanole karşı 517 nm dalga boyunda ölçüldü. % inhibisyon değeri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekstre}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100$$

### 3.8. Enkapsülasyon İşlemi

Enkapsülasyon işlemleri sol-gel ve iyonik jelasyon yöntemleri ile yürütülmüştür. Her iki yöntemle de kan-beyin engelini aşabilecek 100 nm boyutundaki formulasyonlar elde edilmesi hedeflenmiştir. İleriki çalışmalarda (karakterizasyon ve hücre kültürü) kullanılmak üzere boş kitosan nanopartikülleri, etken madde içeren kitosan nanopartikülleri, boş sol-gel nanopartikülleri ve etken madde içeren sol-gel nanopartikülleri hazırlandı.

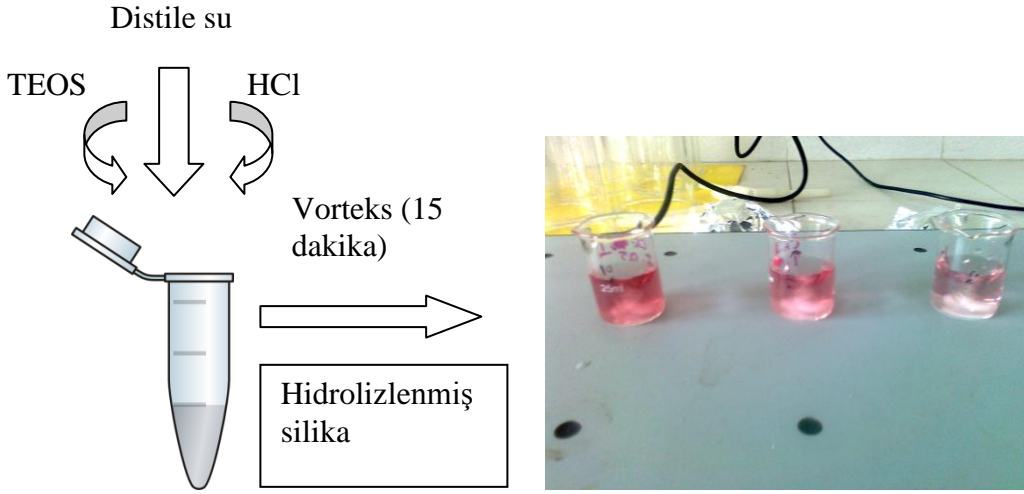
#### 3.8.1. Sol-gel yöntemi

TEOS (tetraetil ortosilikat) HCl asit kullanılarak hidroliz edildi. 0.25 molar TEOS hidrolizlemek için (molekül ağırlığı= 208,33 g mol<sup>-1</sup>) 100 µL, 0.1 molar HCl asit ve 844 µL distile su kullanıldı. Bu karışım 15 dakika boyunca yüksek hızda karıştırıldı. 0.25 molar TEOS 0.025 ve 0.0125 molar olacak şekilde seyreltildi.

pH değeri 8.0 olan 10 mM molar sodyum fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) tamponu hazırlandı ve 0,25 µ filtreden geçirildi. Boş sol-gel partiküllerinin hazırlanması için, hidrolizlenmiş silika (0.025 ve 0.0125 molar), PAMAM (poliaminoamid) dendrimeri ve fosfat tamponu manyetik karıştırıcı altında yüksek hızda 1 saat boyunca karıştırıldı.

Dolu sol-gel formulasyonlarını hazırlamak için, hidrolizlenmiş silika (0.025 ve 0.0125 molar), PAMAM (poliaminoamid) dendrimeri, fosfat tamponu ve en iyi antosiyanin verimini içeren ekstre manyetik karıştırıcı altında yüksek hızda 1 saat boyunca karıştırıldı. Nanopartikül hazırlama süreci Şekil 3.8.1'de gösterilmiştir.

Sürenin sonunda hazırlanan formulasyonlar 15 dakika boyunca 9000 rpm de santrifüj edildi. Enkapsülasyon verimi belirlenmesi için süpernatant toplanarak HPLC ile analiz edilmek üzere ayrıldı. Pellet ise ultra saf su ile 15 dk. 9000 rpm de iki defa yıkanarak 1 gece -80 °C'de bekletildi. -80 °C'den çıkarılan formulasyonlar liyofilize edildi.



Şekil 3.8.1. Sol-gel yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması

### 3.8.2. İyonik jelyasyon ile enkapsülasyon

Çalışmamızda iyonik jelyasyon yöntemi kitosanın TPP (tripolifosfat) gibi bir çapraz bağlayıcı ajanla çapraz bağlanarak nanopartikülleri oluşturması hedeflenmiştir.

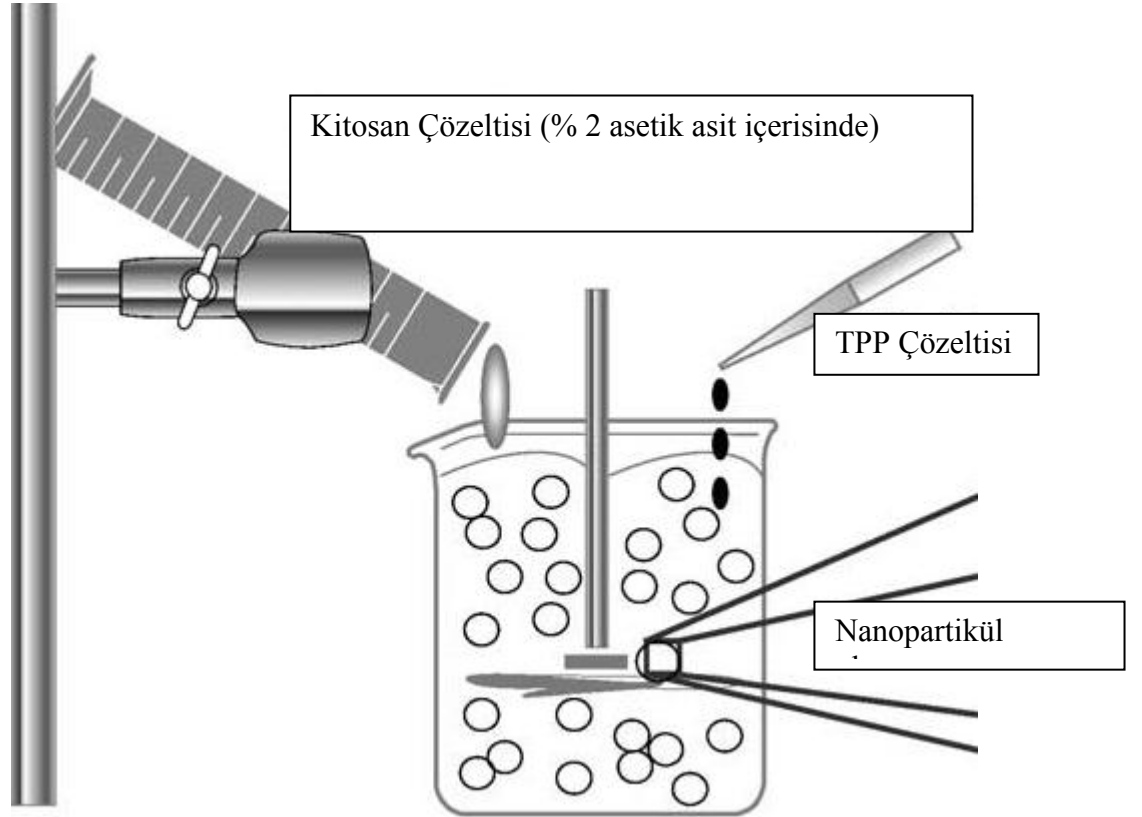
İyonik jelyasyon yöntemini kullanarak istenen partikül boyutuna ulaşmak için uygulanan optimizasyon parametreleri kitosan konsantrasyonu, kitosan:TPP oranı ve karıştırma süresi olarak belirlendi.

0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL ve 3 mg/mL konsantrasyonlarındaki kitosan çözeltileri % 2'lik asetik asit solüsyonu kullanılarak hazırlandı, tamamen çözünmenin gerçekleşmesi için 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda bekletildi. 100 mg/ 100 mL konsantrasyonda tripolifosfat (TPP) çözeltisi hazırlandı.

Boş kitosan nanopartikülleri belirlenen konsantrasyonlardaki kitosan çözeltilerine TPP'nin yavaş yavaş eklenmesiyle elde edildi. Bu formülasyonlar manyetik karıştırıcı altında belirlenen sürelerde karıştırıldı.

Dolu kitosan formülasyonlarının hazırlanması için, belirlenen konsantrasyonlardaki kitosan çözeltilerinin üzerine önceden belirlenen miktarlardaki TPP solüsyonu damla damla ilave edildi. Her formülasyona 1 mL kara havuç ekstresi (enkapsülasyon işlemi için solvent olarak suyun kullanıldığı, solvent ekstraksiyon yönteminin uygulandığı en yüksek derişimde antosiyanin

içeren ekstre seçildi) eklendi. Bu koşullar altında nanopartikül oluşumu manyetik karıştırıcıda, en yüksek hızda gerçekleştirildi. Karıştırma süreleri 1 saat ve 3 saat olarak belirlendi.



Şekil 3.8.2. İyonik jelasyon yöntemi ile nanopartiküllerin oluşumu (Reis et al., 2006)

Belirlenen sürenin sonunda hazırlanan formülasyon 15 dakika boyunca 9000 rpm de santrifüj edilmiştir. Enkapsülasyon verimi belirlenmesi için süpernatant toplanarak HPLC ile analiz edildi. Pellet ise ultra saf su ile 15 dk. 9000 rpm de iki defa yıkanarak ilk olarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye koyulduktan sonra liyofilize edildi.

### 3.9. Dondurulan Örneklerin Liyofilize Edilmesi

Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilmesi için toz halinde kurutulmaları gerekmektedir. Bu amaçla dondurma işlemi süresince partiküllere zarar gelmemesi için trehaloz çözeltisi kullanılır. Santrifüjle yıkama işleminin sonunda elde edilen pelletlere % 11,34'lük trehaloz çözeltisinden karşılaştırma amaçlı %2 (w/w) ve %5 (w/w) oranında eklenerek, pelletin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra sıvı azot içerisinde dondurulup liyofilizatörde 1 gün bekletilmişlerdir.

### 3.10. Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonların partikül boyutları ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Yükleme verimleri ve *in vitro* salım kinetikleri belirlendi. Ayrıca DSC (Diferansiyel Tarama Kalorimetresi), XRD (X-Işınları Difraktometresi) analizleri ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntülemesi yapıldı.

#### 3.10.1. Zeta potansiyeli ve partikül boyutunun ölçülmesi

Hazırlanan formülasyonların partikül boyutları ve zeta potansiyelleri Malvern zetasiser cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Nanopartiküller 3 kez santrifüjle yıkandıktan sonra distile su kullanılarak nanopartiküller disperse edilmiştir. Tek kullanımlık ölçüm kuvvetlerine alınan nanopartikül dispersiyonlarının sırasıyla partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Bu analiz, tüm formülasyonlar için her bir ölçüm üç kez tekrarlanarak yapılmıştır.

#### 3.10.2. Yükleme veriminin belirlenmesi

Yükleme veriminin belirlenmesi için en yüksek antosiyanin miktarının elde edildiği solvent ekstresi kullanıldı. Bu ekstrenin 10 kat, 20 kat ve 30 kat seyreltilmiş stokları hazırlanarak sırasıyla formülasyonlara eklendi.

100 nm partikül boyutunun elde edildiği koşulların kullanıldığı iyonik jelasyon ve sol-gel yöntemleriyle enkapsülasyon işlemi gerçekleştirildi. Nanopartikülleri içeren karışım 9000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatantlar toplanarak UPLC cihazı ile analiz edildi. Standart maddenin kalibrasyon grafiğinin denklemine göre süpernatantların içerdiği antosiyanin miktarı belirlendi. Bu analiz sonucunda partiküllere yüklenmeyen antosiyanin miktarı belirlenmiş oldu (dolaylı yöntem). Aşağıdaki eşitliğe göre yükleme verimi belirlendi.

$$\text{Yükleme verimi} = \frac{100 - \text{süpernatantın antosiyanin içeriği}}{\text{partiküle yüklenen toplam antosiyanin miktarı}} \times 100$$

### **3.10.3. *In vitro* salım kinetiklerinin belirlenmesi**

*In vitro* salım çalışmaları, 100 rpm hızda ve 37°C sabit sıcaklıkta çalışan inkübatör içerisindeki çalkalayıcı karıştırıcıda diyaliz torbası yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma hem sol-gel hem de iyonik jelasyondan elde edilen 100 nm boyutundaki formülasyonlar için 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür.

Molekül büyüklüğü geçirgenlik sınırı 500 dalton olan diyaliz membranlar 15 dakika distile suda bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra içlerine ultra saf su ile disperse edilmiş nanopartiküllerden 1 mL koyularak iki tarafı kapatılmış, 100 mL pH değeri 7.4 olan fosfat tamponu içeren salım ortamında dissolüsyon çalışmaları başlatılmıştır. Belirlenen süreler aralığında salım ortamından 100 µL örnek çekilerek yerine çekilen örnek kadar fosfat tamponu eklenmiştir.

UPLC ile salınan antosiyanin miktarı standart için elde edilen kalibrasyon denkleminde hesaplanmıştır ve salınan madde-zaman grafiği elde edilmiştir. Salınan madde miktarı sabit olana kadar test devam etmiştir.

### **3.10.4. DSC (Diferansiyel tarama kalorimetresi) yöntemi**

DSC analizleri Perkin Elmer marka DSC kalorimetre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

İyonik jelasyon ile hazırlanmış dolu ve boş nanopartiküller, sol-gel metoduyla hazırlanmış dolu ve boş nanopartiküller DSC analizi için 5-10 mg aralığında tartılarak örnek kaplarına koyuldu. 30°C-200°C aralığında, ısıtma oranı 10°C/dk. olacak şekilde tarama yapıldı. Referans olarak boş bir örnek kabı kullanıldı.

### **3.10.5. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri**

Nanopartikül formülasyonlarının yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. İyonik jelasyon ve sol-gel yöntemlerinde istenen patikül büyüklüklerinin elde edildiği formülasyonlar için ve ayrıca boş formülasyonlar için nanopartiküllerin SEM ölçümleri taramalı elektron mikroskopuyla gerçekleştirildi.



### 3.11. Sitotoksisite Testleri

Yüksek oranda antosiyanin içeren kara havuç ekstralarının sitotoksik etkilerini belirlemek için Neuro 2-A hücre hattı kullanılarak sitotoksisite çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmada kullanılan Neuro 2-A hücre hattı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'ndan sağlandı.

#### 3.11.1. Neuro 2-A hücre hattı kültür koşulları

Neuro 2-A neuroblastoma hücre hattı fare beyin dokusundan izole edilmiştir.

Neuro 2-A beyin tümörü hücreleri %10 (h/h) fetal sığır serumu, % 1 penisilin/streptomisin (100 ünite/ml) içeren RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) besiyeri içerisinde, 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyütülmüştür. Hücreler 3-4 günde bir alt kültüre alınmıştır.

Ayrıca, ekstraların ve enkapsüle formların sitotoksik aktivitesini farklı hücre hatlarında da gözlemlemek amacıyla MCF7, Saos-2, Vero, A549, MDA-MB-231 ve NA2A hücre hatları da sitotoksisite çalışmaları sırasında kullanıldı.

#### 3.11.2. Serbest haldeki ekstraların, boş ve etken madde içeren partiküllerin Neuro 2-A hücre hattına sitotoksik etkisinin belirlenmesi (MTT testi)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi, sarı renkli MTT tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından mor formazan kristallerine indirgemesine dayalı bir yöntemdir (Mossman, 1983).

Sitotoksisite çalışmalarında kullanılmak üzere en iyi antosiyanin içeriğine sahip ekstre ve bu ekstrenin enkapsüle formu kullanıldı. Ayrıca boş formülasyon da kaplama materyalinin hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırılması için kontrol amaçlı kullanıldı. Buna göre, serbest haldeki ekstre, kaplanmış formdaki ekstre ve boş formülasyon için 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml konsantrasyonlarında stok solusyonlar hazırlandı ve hücre canlılığına olan etkileri 24 saat süre ile araştırıldı.

Hücre hatları normal pasajlama prosedüründe olduğu şekilde tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldı, santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet

1mL besi ortamıyla homojenize edildi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra Neuro 2-A hücreleri her kuyucukta 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarına dağıtıldı ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

24 saat sonunda besi ortamı uzaklaştırılıp taze besi ortamı eklendikten sonra belirlenen dozlarda (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml ve 3.125 µg/ml) ekstre, dolu formulasyon ve boş formulasyon kuyucuklara 3 tekrarlı olarak eklendi ve eklendiği kuyucuklar 24 saat boyunca tekrar inkübasyona bırakıldı.

Bu sürenin sonunda besi ortamı uzaklaştırılıp taze besi ortamı ve toplam hacmin % 10'u kadar MTT kimyasalı eklenerek 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için besi ortamının hacmine eşit hacimde MTT çözücü solüsyon eklenip, birkaç dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir.

Bu işlemden sonra 96 kuyucuklu plaka, mikrolaka okuyucu spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda okutuldu. Canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edildi.

$$\frac{\text{Ekstre uygulanan kuyu absorbans ortalaması}}{\text{Kontrol grubu kuyucuklarının absorbans ortalaması}} \times 100 = \text{canlılık oranı}$$

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Ekstrelerin Antosiyanin Miktarları

Bağımsız değişkenlerin sıcaklık, katı:sıvı oranı ve ekstraksiyon süresi olarak seçildiği deney tasarım programına göre 15 run ın ekstraksiyonu etanol kullanılarak gerçekleştirildi. Deney tasarım programında Box-Behnken yöntemi ile tüm ekstraksiyon işlemleri için anlamlı deney tasarım modelleri elde edildi. Bu anlamlı modele göre en yüksek antosiyanin içeriğinin elde edilmesini sağlayacak optimum değerler (desirability point) ve ekstraksiyon koşulları belirlendi. Programın çıktısı olarak elde edilen bu yeni (optimum) koşullarda ekstraksiyonlar etanol kullanılarak tekrarlandığında antosiyanin verimleri doğrulandı.

Bu optimum koşullarda, her üç ekstraksiyon yöntemi için aynı koşullar su kullanılarak tekrarlandı. Suyun polaritesi etanole göre daha yüksek olduğu için ve antosiyaninler de polar çözümlerde daha iyi çözümlerinden en iyi antosiyanin verimi solvent olarak su kullanıldığında elde edildi. Su kullanıldığında ekstraktların rengi etanol kullanılan ekstraktlara göre daha koyu kırmızı olarak gözlemlendi.

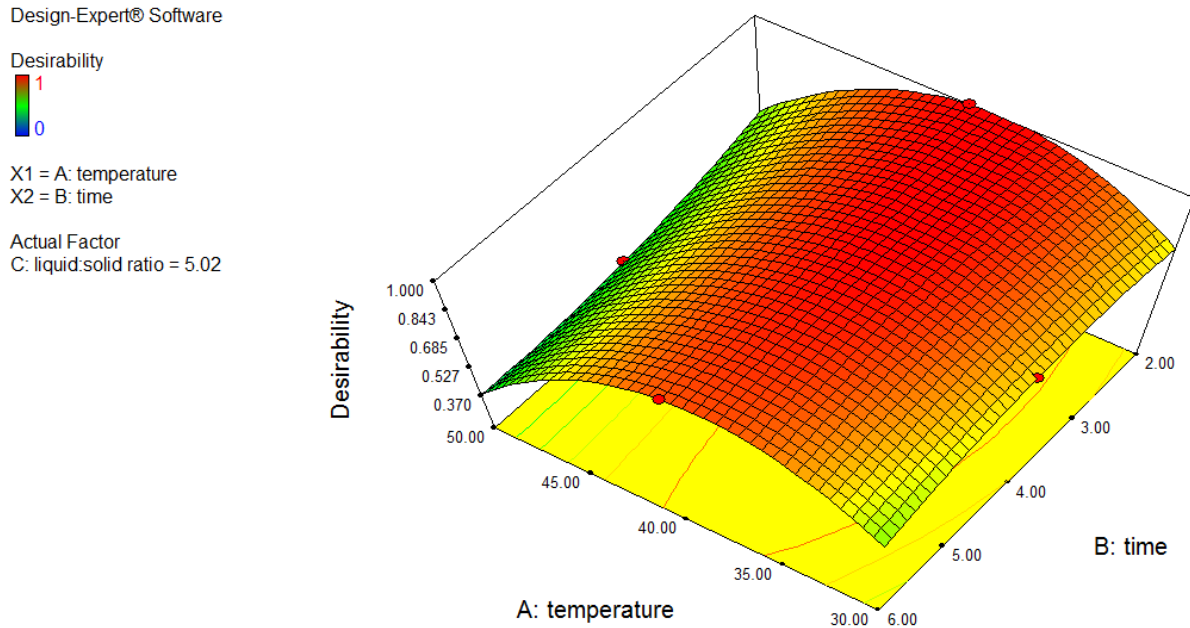
Çizelge 4.1’de her üç ekstraksiyon yöntemi için de deneysel tasarım programından elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları ve bu koşullarda pH farklılığı yöntemine göre hesaplanan antosiyanin miktarları gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 pH farklılığı yöntemine göre hesaplanan antosiyanin miktarları

Ekstraksiyon Yöntemi	Sıcaklık (°C)	Süre	Sıvı:Katı Oranı	Maksimum Antosiyanin Verimi
Ultrasonik Ekstraksiyon	50	40 dk.	5:1	113.17 mg/L
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	60	9 dk.	5:1	101.62 mg/L
Solvent Ekstraksiyonu	40	3s20dk.	5:1	89.47 mg/L

### 4.1.1 Solvent ekstraksiyonu

Deneysel tasarım programında, Box-Behnken deneysel tasarım yöntemine göre solvent ekstraksiyonu deney seti için optimum ekstraksiyon koşulları belirlendi. Buna göre; sıcaklık yaklaşık olarak 40°C, katı:sıvı oranı 1:5 ve 3 saat 20 dakika olan ekstraksiyon süresinin optimum koşullar olduğu belirlendi. Bu koşullar tekrarlandığında pH farklılığı yöntemine göre antosiyanin miktarı 89.47 mg/L (maksimum değer) olarak bulundu. Box-Behnken deneysel veri programına göre oluşturulan üç boyutlu istenebilirlik (desirability) grafiği Şekil 4.1.1' de gösterilmektedir.

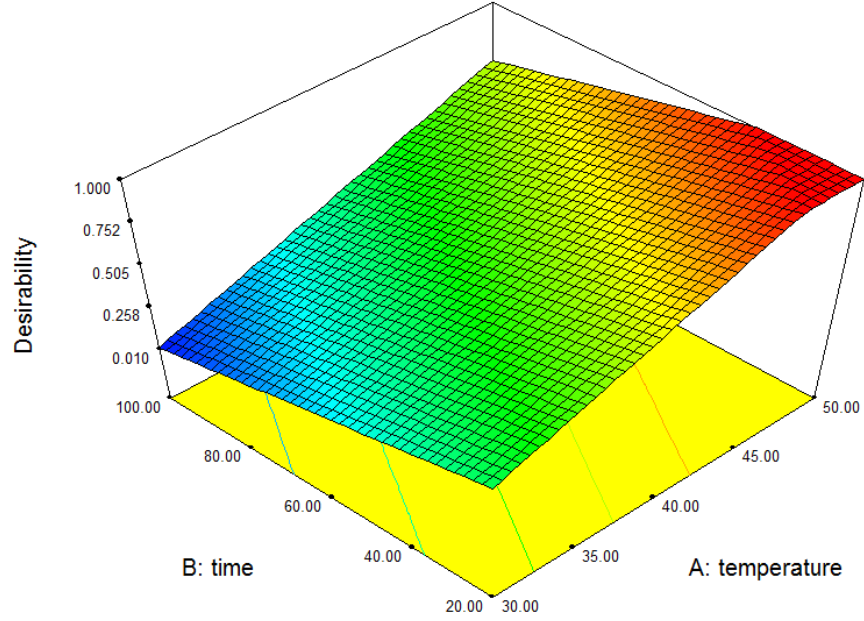


Şekil 4.1.1. Solvent ekstraksiyonu için istenen nokta (desirability point) değerleri

### 4.1.2. Ultrasonik ekstraksiyon

Design Expert programında Box-Behnken deneysel tasarımı ile solvent olarak etanolün kullanıldığı 15 run lı deney setinde anlamlı bir model elde edildi. Buna göre; ultrasonik ekstraksiyon için optimum ekstraksiyon koşulları; sıcaklık yaklaşık olarak 50°C, katı-sıvı oranı 1:5 olduğunda ve yaklaşık 40 dakikalık bir ekstraksiyon süresi uygulandığında elde edildi (Şekil 4.1.2). Bu bağımsız değişkenler kullanılarak ekstraksiyon işlemi tekrarlandığında elde edilen antosiyanin miktarı 113.17 mg/L dir.

Design-Expert® Software  
 Desirability  
 1  
 0  
 X1 = A: temperature  
 X2 = B: time  
 Actual Factor  
 C: liquid:solid ratio = 5.26

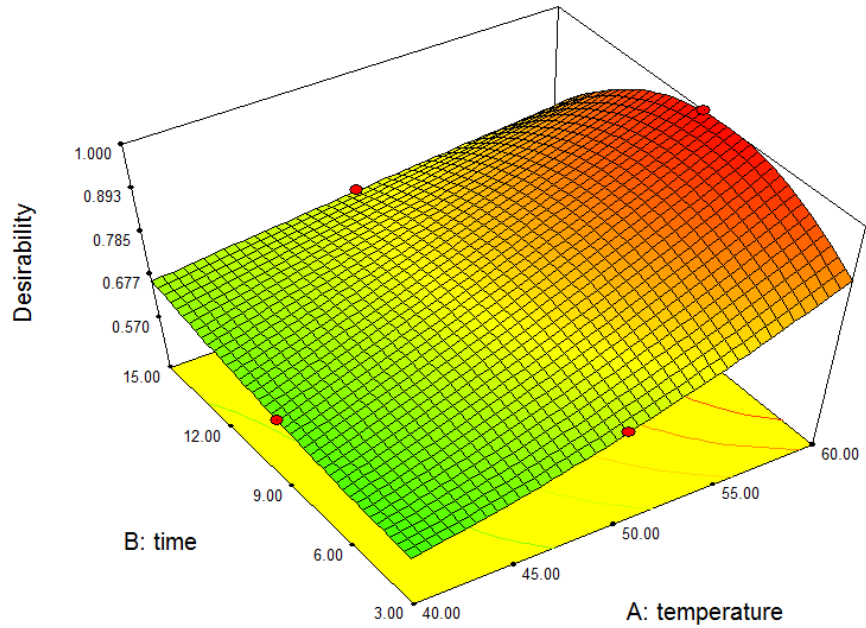


Şekil 4.1.2. Ultrasonik ekstraksiyon için istenen nokta (desirability point) değerleri

### 4.1.3. Mikrodalga ekstraksiyonu

Box-Behnken deneysel tasarımıyla optimize edilen mikrodalga ekstraksiyon sistemi için optimum ekstraksiyon koşulları, 60 °C sıcaklıkta, katı:sıvı oranının 1:5 (g/mL) olduğu, yaklaşık olarak 9 dakikalık bir ekstraksiyon prosesi sonucunda elde edilmiştir (Şekil 4.1.3). Bu bağımsız değişkenler kullanılarak ekstraksiyon işlemi tekrarlandığında elde edilen antosiyanin miktarı 101.62 mg/L dir.

Design-Expert® Software  
 Desirability  
 1  
 0  
 X1 = A: temperature  
 X2 = B: time  
 Actual Factor  
 C: liquid:solid ratio = 5.02



Şekil 4.1.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için istenen nokta (desirability point) değerleri

## 4.2. UPLC Analizi ile Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi

Kompleks glikosilasyon modelleri antosiyaninlerin belirlenmesini LC-MS kullanıldığında dahi zorlaştırır (Li et. al, 2011). Bu nedenle yapılan çalışmada, kara havuç ekstralarında UPLC analizi sonrası 3 ana pik belirlendi ve bunlar siyanidin-3-glikozid eş değeri olarak ifade edildi (Netzel et. al, 2007).

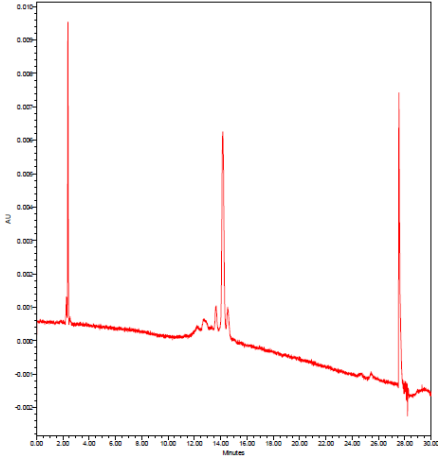
pH farklılığı yöntemiyle hesaplanan ekstradaki antosiyanin miktarları sonucunda deneysel tasarım programında anlamlı sonuçlar elde edildi ve optimum koşullar belirlendi. Bu optimum koşullarda her üç ekstraksiyon yöntemi de solvent olarak kullanılarak tekrarlandı. Bu ekstradaki antosiyanin miktarı hem pH farklılığı yöntemiyle (Bkz. Bölüm 4.1) hesaplandı hem de UPLC cihazı ile analiz edildi. Siyanidin-3-glikozidin standart olarak kullanıldığı kalibrasyon eğrisi bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde hazırlandı ve antosiyanin içerikleri  $y=3,95e004x - 2,29e005$  denklemine göre hesaplandı.

UPLC’den elde edilen sonuçlara göre, her yöntem için etanollü ekstralarda 3 temel pik gözlenmiş ve bu pikler 10-16. dakikalar arasında elde edilmiştir (Şekil 4.2). Solvent olarak etanol kullanıldığında solvent, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri için UPLC analizi ile hesaplanan antosiyanin miktarları sırası ile 17,07 µg/mL, 22,46 µg/mL, 18,86 µg/mL bulunmuştur.

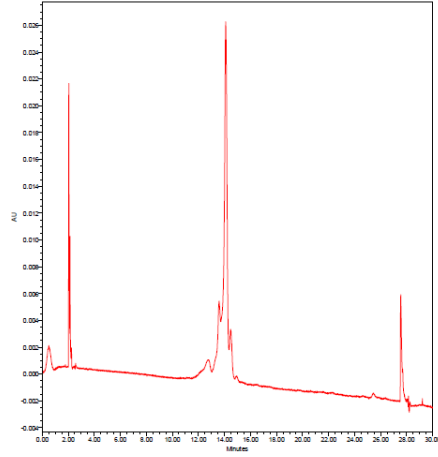
Elde edilen optimum koşullarda her üç ekstraksiyon yöntemi de solvent olarak suyun kullanılmasıyla içerdikleri antosiyanin miktarı etanollü ekstralara göre kıyaslanmıştır.

Solvent olarak su kullanılan ekstraların kromatogramlarında da etanollü ekstradakiyle aynı şekilde 3 pik gözlenmiş, ve yine 10-16. dakikalar arasında elde edilmişlerdir. Solvent olarak su kullanıldığında solvent, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri için UPLC analizi ile hesaplanan antosiyanin miktarları sırası ile 2090,4 µg/mL, 1825,2 µg/mL ve 1540,4 µg/mL bulunmuştur.

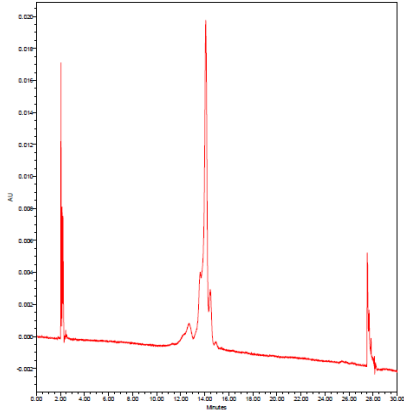
Solvent olarak su kullanıldığında elde edilen antosiyanin miktarlarının etanollü ekstralara göre oldukça fazla olmasının nedeni bu ekstraksiyon işlemlerinde kara havuç içerisindeki antosiyaninlerin daha etkili bir biçimde alınmış olmasından kaynaklanmaktadır ve suyun polaritesi etanole göre daha yüksektir.



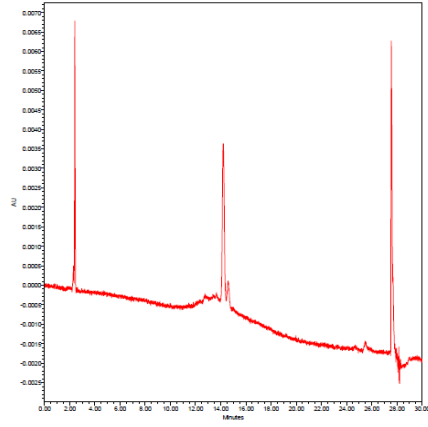
(a)



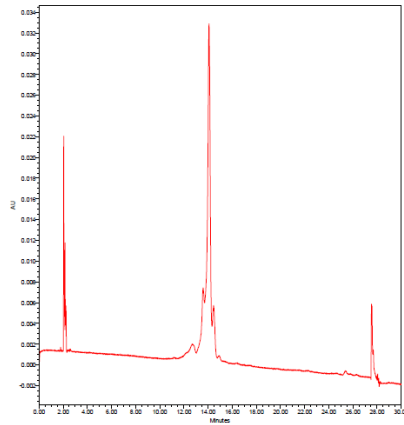
(b)



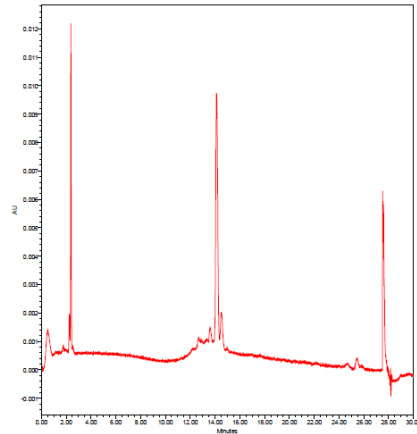
(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 4.2. Ekstrelerin 520 nm'deki UPLC kromatogramları: (a) Mikrodalga destekli ekstraksiyon, solvent su, (b) Mikrodalga destekli ekstraksiyon, solvent etanol, (c) Solvent ekstraksiyonu, solvent etanol, (d) Solvent ekstraksiyonu, solvent su, (e) Ultrasonik ekstraksiyon, solvent etanol, (f) Ultrasonik ekstraksiyon, solvent su

### 4.3. Kara Havuçta Bulunan Toplam Fenol Miktarı

Kara havuç ekstralarında bulunan toplam fenolik içerik Bölüm 3.6'da anlatılan yöntemle göre hesaplanmıştır. Buna göre her üç ekstraksiyon yöntemi için hem etanol hem de su kullanılarak yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen toplam fenol miktarları Çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. Kara havuç ekstralarının toplam fenol miktarları

Ekstraksiyon Yöntemi	Solvent:Su	Solvent:Etanol
Ultrasonik Ekstraksiyon	22,62 mg GAE/g ekstre	1,48 mg GAE/g ekstre
Solvent Ekstraksiyonu	21,14 mg GAE/g ekstre	5,18 mg GAE/g ekstre
Mikrodalga Ekstraksiyonu	16,92 mg GAE/g ekstre	2,1 mg GAE/g ekstre

### 4.4. Kara Havucun Serbest Radikal Süpürme Aktivitesi

Kara havuç ekstralarının antioksidan aktivitesi Bölüm 3.7'de anlatılan DPPH yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre her üç ekstraksiyon yöntemi için hem etanol hem de su kullanılarak yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Kara havuç ekstralarının antioksidan aktivite miktarları

Ekstraksiyon Yöntemi	Solvent:Su	Solvent:Etanol
Ultrasonik Ekstraksiyon	% 1,3	% 1,55
Solvent Ekstraksiyonu	% 2	% 4,31
Mikrodalga Ekstraksiyonu	% 4,23	% 5,6



## **4.5. Karakterizasyon Çalışmaları**

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında partiküllerin boyutu ve zeta potansiyeline bakıldı, yükleme verimi hesaplandı. XRD ve DSC analizleri yapıldı. Bunlara ek olarak taramalı elektron mikroskobu ile partiküllerin görüntülemesi yapıldı.

### **4.5.1. Zeta potansiyeli ve partikül boyutu**

Partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri Malvern zetasizer cihazı kullanılarak yapıldı. Farklı polimer konsantrasyonlarının ve sürelerin denendiği iyonik jelasyon yöntemi için elde edilen partikül boyutları Çizelge 4.5.1 de gösterilmiştir. Bu formülasyonların kan-beyin bariyerini aşması hedeflendiği için 90-150 nm partikül boyutu aralığının elde edildiği 2 nolu formülasyon ileriki salım ve hücre kültürü çalışmaları için seçilmiştir. İstenen partikül boyutuna sahip 2 nolu formülasyon için zeta potansiyeli 30,38 mV olarak ölçüldü.

Çizelge 4.5.1. İyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyon sonucu elde edilen partikül boyutları

Formulasyon no	Kitosan konsantrasyonu (mg/mL)	Kitosan:TPP oranı	Süre (saat)	Partikül Boyutu (nm)
No.1	0.5	2.5:1	1 saat	255,7
No.2	0.5	4:1	1saat	123,6
No.3	1.0	2.5:1	1saat	284
No.4	1.0	4:1	1saat	418
No.5	2.0	2.5:1	1saat	518,2
No.6	2.0	4:1	1saat	515,3
No.7	3.0	2.5:1	1saat	380
No.8	3.0	4:1	1saat	415
No.9	0.5	2.5:1	3 saat	180,7
No.10	0.5	4:1	3 saat	162,4
No.11	1.0	2.5:1	3 saat	169,4
No.12	1.0	4:1	3 saat	301
No.13	2.0	2.5:1	3 saat	383,1
No.14	2.0	4:1	3 saat	509,2
No.15	3.0	2.5:1	3 saat	549,1
No.16	3.0	4:1	3 saat	792,4

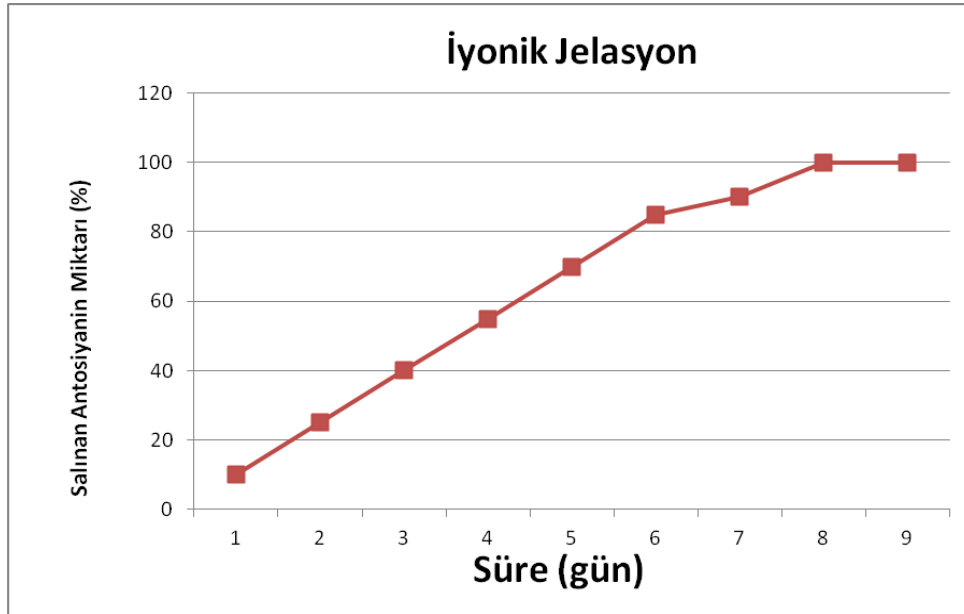
Sol-gel yöntemi için 2 farklı polimer konsantrasyonu ile denemeler yapıldı. 0,025 M biosilika ve 0,0125 M biosilika kullanılarak kaplanan etken maddenin boyutları sırasıyla, 134,8 nm ve 188,6 nm olarak bulunmuştur. Partikül boyutu 134,8 olan formulasyon ileriki çalışmalar için uygun bulundu ve bu formulasyonun zeta potansiyeli 19,78 mV olarak ölçüldü.

#### 4.5.2. Yükleme verimi

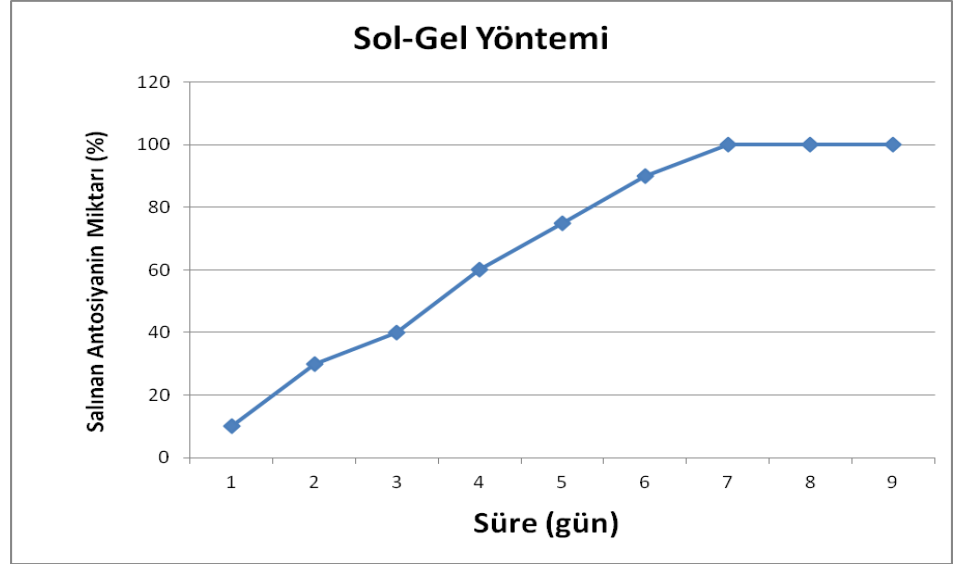
İyonik jelasyon ve sol-gel yöntemi için ayrı ayrı enkapsülasyon verimleri hesaplandı. İyonik jelasyon yönteminin yükleme verimini hesaplamak için formulasyon no. 2 kullanılırken sol-gel metodu için 0,025 M biosilikanın kullanıldığı formulasyon seçildi. Yükleme verimleri Bölüm 3.10.2’de anlatıldığı şekilde hesaplandı. Buna göre yükleme verimleri iyonik jelasyon ve sol-gel metodu için sırasıyla % 85 ve % 70 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.5.3. *In vitro* salım kinetikleri

Bölüm 3.10.3’de anlatıldığı üzere yapılan dissolüsyon çalışmalarında zamana karşı % antosiyanin konsantrasyonları grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.5.3.1 ve Şekil 4.5.3.2’de salım grafikleri verilmiştir.



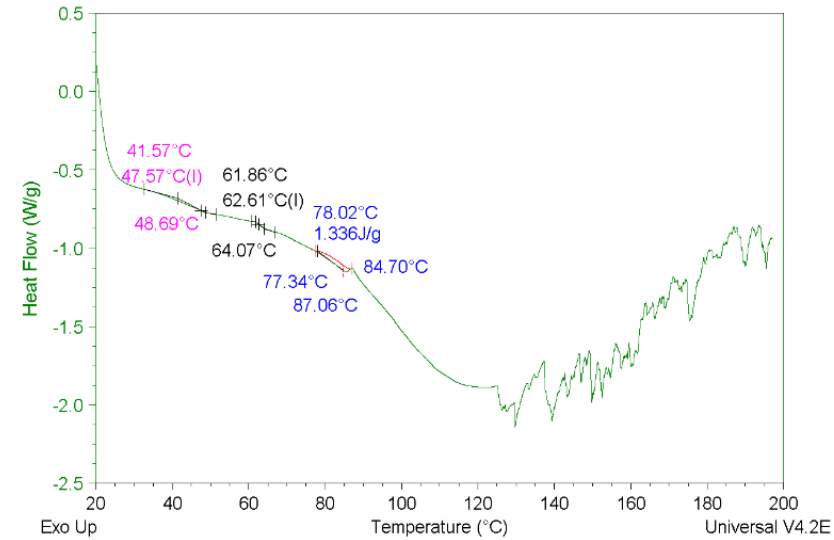
Şekil 4.5.3.1. İyonik jelasyon yöntemi ile kaplanan ekstrenin salım grafiği



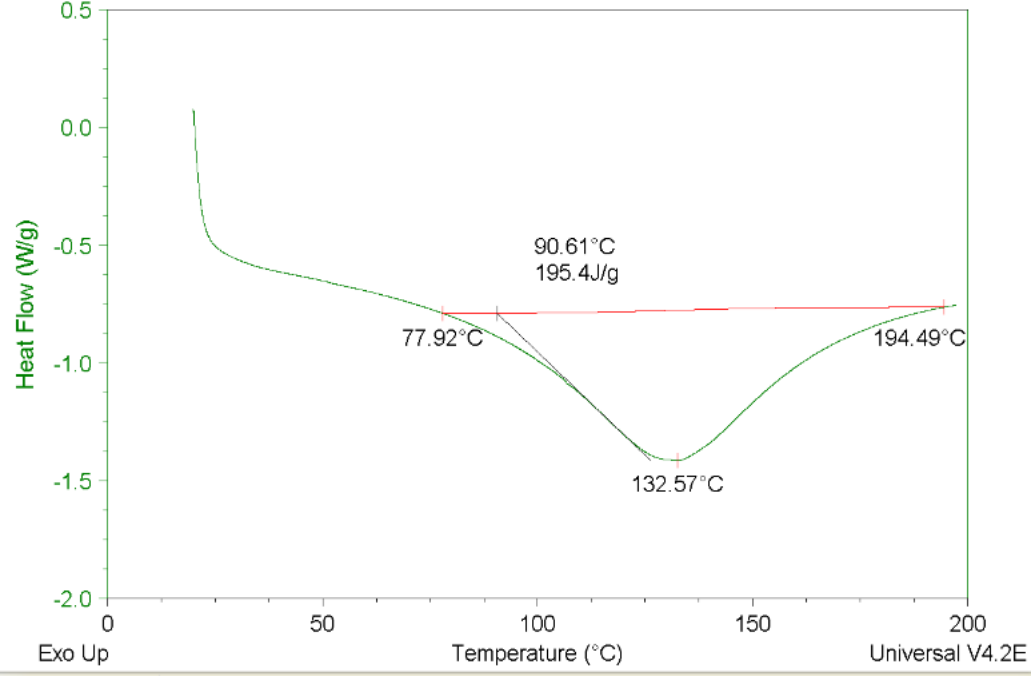
Şekil 4.5.3.2. Sol-Gel yöntemi ile kaplanan ekstrenin salım grafiği

#### 4.5.4. DSC analiz sonuçları

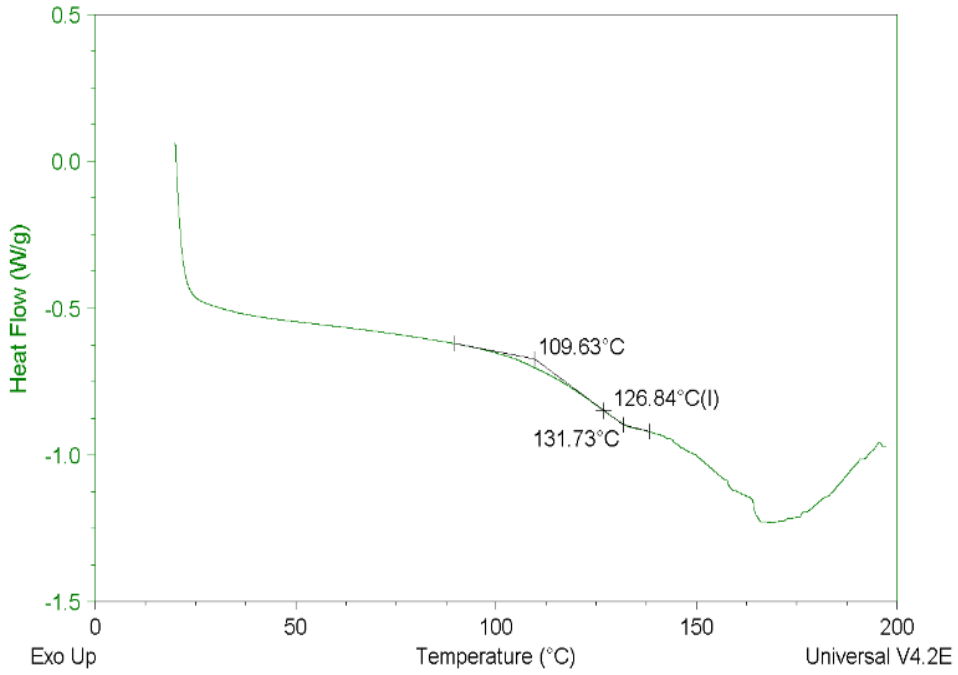
Ekstrenin (Şekil 4.5.4.1), iyonik jelasyon dolu (Şekil 4.5.4.2) ve boş formülasyonlarının (Şekil 4.5.4.3), sol-gel dolu formülasyonunun (Şekil 4.5.4.4) DSC termogramları çekildi. Bu termogramlar sayesinde, kaplama materyali ile ekstre arasında bir etkileşim olup olmadığına, artan sıcaklık ile örneklerin özelliklerinin nasıl değiştiğine, yapının amorf ya da kristal olmasına ve etkin bir kaplamanın gerçekleşip gerçekleşmediğine bakıldı.



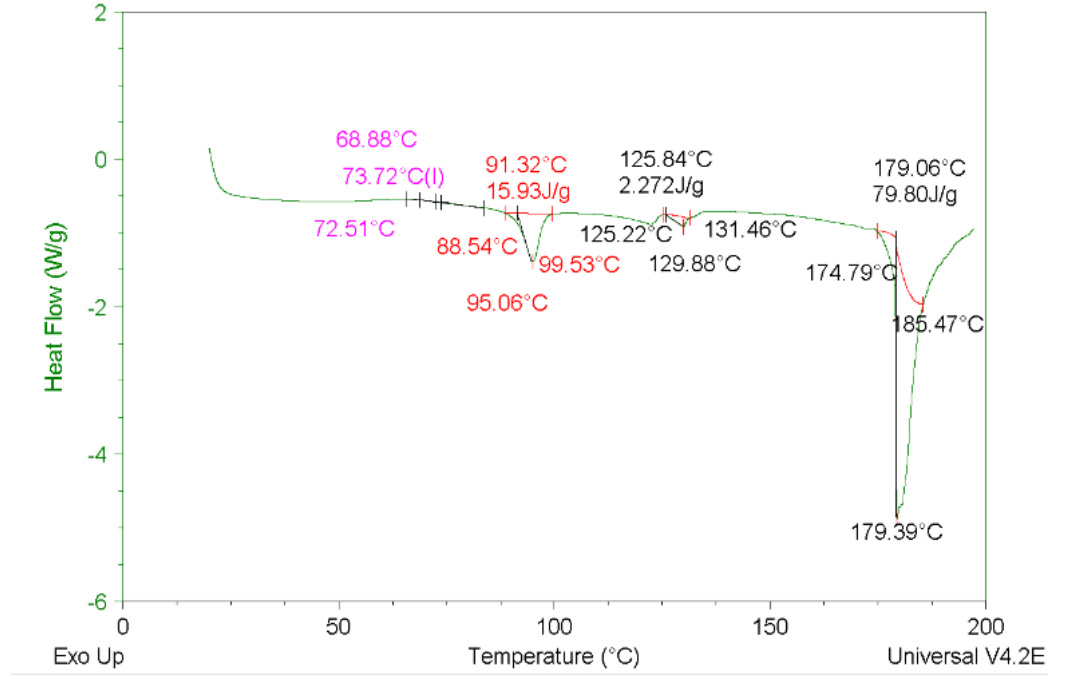
Şekil 4.5.4.1 Antosiyanin DSC termogramı



Şekil 4.5.4.2 İyonik jelasyon dolu formülasyon DSC termogramı



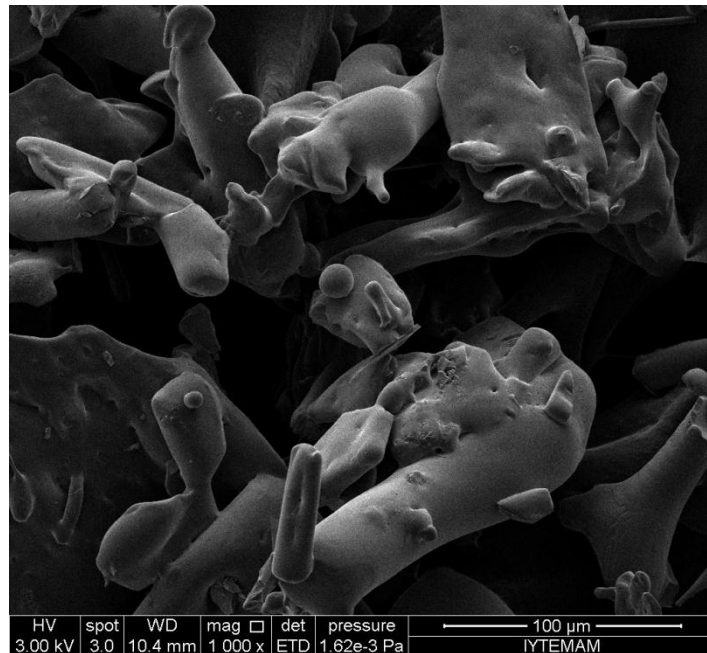
Şekil 4.5.4.3 İyonik jelasyon boş formülasyon DSC termogramı



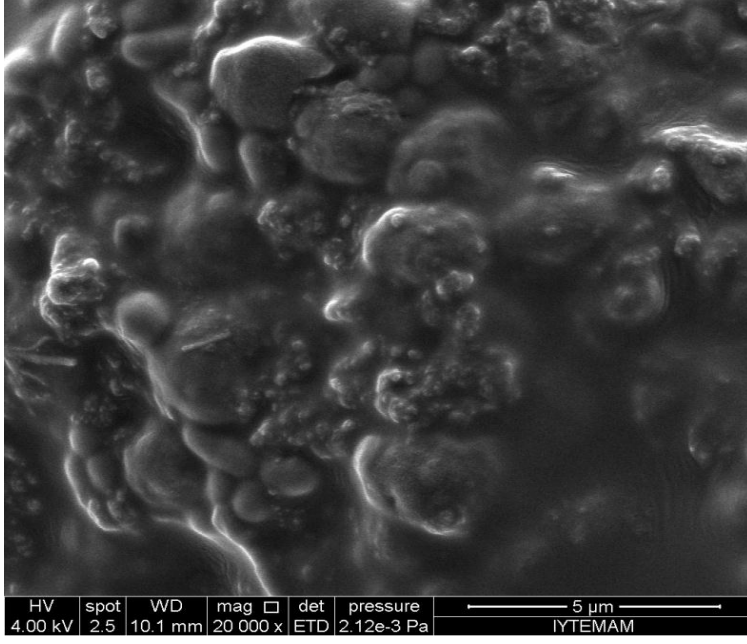
Şekil 4.5.4.4 Sol-Gel dolu formülasyon DSC termogramı

#### 4.5.5 SEM görüntüleri

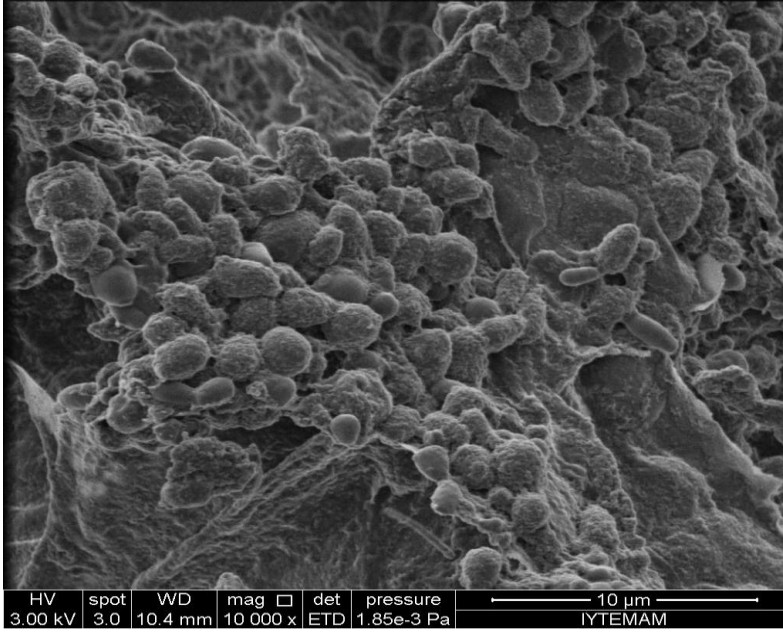
İyonik jelasyon yöntemi için boş ve ekstre içeren partiküllerin, sol-gel yöntemi için de ekstre içeren partiküllerin taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri Şekil 4.5.5.1, 4.5.5.2 ve 4.5.5.3 'de sırasıyla görüntülenmektedir.



Şekil 4.5.5.1 İyonik jelasyon yöntemi boş formülasyon



Şekil 4.5.5.2 İyonik jelasyon dolu formülasyon

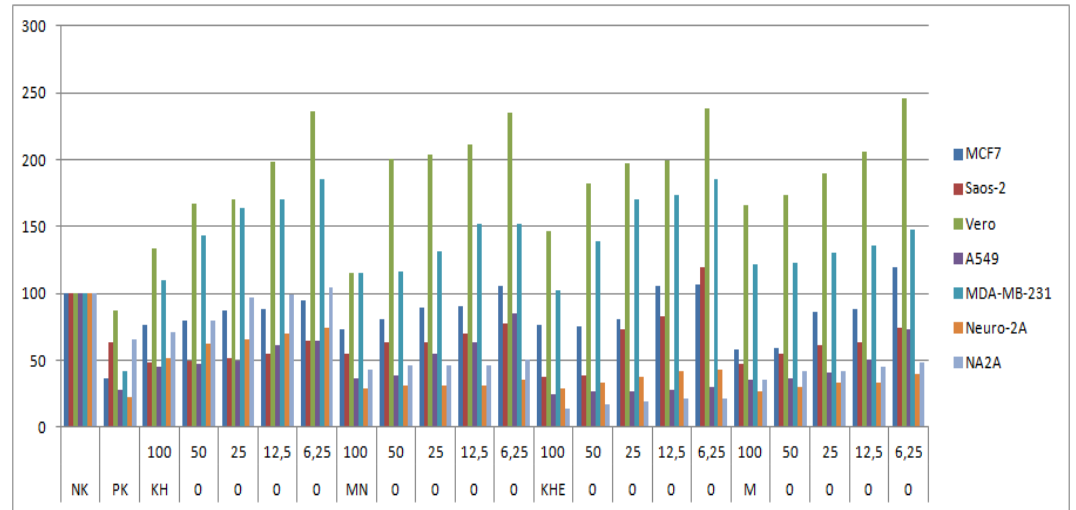


Şekil 4.5.5.3 Sol-Gel dolu formülasyon

#### 4.5.6 MTT testi sonuçları

MTT testi sonuçlarına göre, kara havuç ekstresinin 6 µg/mL gibi düşük bir konsantrasyonda MCF-7, Saos-2, A549 ve Neuro 2A hücre hatlarında sitotoksik etkisinin olduğu gözlenmiştir. Bu hücre hatlarındaki canlılık oranı % 50 nin altındadır (Şekil 4.5.6). Bu hücrelere sitotoksik olan kara havuç ekstresinin normal sağlıklı (Vero) hücre hattında aynı konsantrasyonda sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.

İyonik jelasyon yöntemi ile enkapsüle edilmiş kara havuç ekstrlerinde 6 µg/mL konsantrasyonda A549, Neuro 2A ve NA2A hücre hatlarında % 50 nin altında hücre canlılığı gözlenmiştir (Şekil 4.5.6). Kaplanmamış ekstrdekine benzer şekilde nanopartiküllerin de Vero hücre hattında sitotoksik etkisi yoktur.



Şekil 4.5.6 Kara havuç ekstresinin (KH) ve iyonik jelasyon ile kaplanmış ekstrlerin (KHE) çeşitli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi



## 5. SONUÇ

Çalışmanın başlangıcında hedeflendiği üzere, çalışmanın sonunda kara havuçların ekstraksiyonunun optimizasyonu üç farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiş ve en uygun ekstraksiyon koşulları bulunmuştur. Optimizasyon parametreleri olarak; katı:sıvı oranı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresinin ele alındığı sistemimizde optimizasyon deneysel tasarım programında Box-Behnken yüzey yanıt metodolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre, her üç ekstraksiyon metodu için en iyi antosiyanin verimi katı:sıvı oranının 1:5 olduğu durumda elde edilmiştir. 1:15 ve 1:25 gibi yüksek solvent oranlarının kullanımının önlenmesiyle hem ekonomik hem de çevreci bir yaklaşım elde edilmiştir. Ayrıca mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin kullanılmasıyla çok daha kısa sürelerde (örneğin; 9 dakika) yüksek antosiyanin verimleri elde edilmiştir (101.62 mg/L). Antosiyaninlerin ısıl stabilitesi düşük olduğu için ekstraksiyon işlemlerinde 60°C sıcaklığın üzerinde çalışılmamıştır. Solvent ekstraksiyonunda en yüksek antosiyanin verimi 40°C gibi nispeten düşük bir sıcaklıkta elde edilmiştir (89.47 mg/L).

Ekstraksiyon işlemlerinde solvent olarak su kullanıldığında etanolün kullanılmasına göre yaklaşık 20 kat daha fazla antosiyanin elde edilmiştir.

Üretimi için gerekli optimum ayırma prosesinin geliştirilmesinin ardından antosiyaninlerin stabilitelerinin ve besin olarak alınan antosiyaninlerin biyoyararlanımlarının düşük olmasına odaklanıldı. Çiğ ve pişirilmiş kara havuçlarla ve havuç suyuyla insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalar sonucunda kara havuçta bulunan antosiyaninlerin biyoyararlanabilir ve tümüyle absorblanabilir oldukları ortaya konulmuştur. Ancak direkt alındıklarında biyoyararlanım düşük verimlilikte gerçekleşmektedir (Charron et al., 2009; McGhie and Walton 2007; Manach et al., 2005; Kurilich et al., 2005). Bu çalışmalardan yola çıkarak kara havuçta bulunan antosiyaninlerin insanlarda daha iyi seviyelerde biyoyararlanımını ve verimliliğini sağlamak amacıyla antosiyanin içeren ekstreyi ve uygun polimeri bir araya getirecek etkili bir enkapsülasyon formulasyonu hazırlandı. Enkapsülasyon işlemi için iyonik jelasyon yöntemi ve yeni bir teknoloji olan sol-gel yöntemi kullanıldı. Bir seri denemeler yapılarak kaplama işleminin optimizasyonu sağlandı. Ve *in vitro* salım koşullarında her iki formulasyon ile de benzer , uzun süreli bir salım kinetiği elde edildi. İlk 90 dakika

etken maddenin tampon ortamında dedekte edilmemesi, etken maddenin nanopartiküller içerisine tamamen hapsediğini ve yüzeyde adsorblanan hiç etken madde olmadığını göstermektedir.

Bu çalışma ile birlikte, çeşitli hücre hatlarında çağımızın hastalığı olan kansere doğal bir ürünle tedavi şansı mümkün olabilecektir. Bu nedenle ileriki *in vivo* ve kliniğe aktarım çalışmaları açısından önemli bir alt yapı elde edilmiş oldu.

İlerleyen çalışmalarda, farklı kaplama yöntemlerinin de antosiyaninlerin stabilitesine etkileri denenebilir. Hazırlanan bu nanopartiküllerin kısa ve uzun dönem stabilite testlerine bakılması, farklı kanser hücre hatlarındaki etkileri, kan-beyin bariyerini taklit eden yapı iskeleleri ile partiküllerin bu membrandan geçişinin modellenmesi ve en önemlisi de kara havuç bitkisinin doğal bir antikanser ilaç olarak değerlendirilebilmesi için *in vivo* ve kliniğe geçiş gibi çalışmaların yapılması daha ileri çalışmalar olarak önerilmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahrné, L., Chamayou, A., Dewettinck, K., Depypere, F., Dumoulin, E., Fitzpatrick, J. and Meesters, G.**, 2008, Processing of Food Powders. In: Food Materials Science, Principles and Practice, Springer, New York, p. 341–368, (Chapter 16).
- Alasalvar C., Grigor JM., Zhang D., Quantick PC. and Shahidi F.**, 2001, Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties, J Agric Food Chem p. 49:1410–1416.
- Ananga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phills, B. and Tsolova, V.**, 2013, Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries.
- Andersen, O.M. and Jordheim, M.**, 2006, The anthocyanins In: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, London, p. 471–552.
- Arscott SA. and Tanumihardjo SA.**, 2010, Carrots of many color provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. Comp Rev Food Sci Food Safety, p. 9:223–239.
- Arshady, R.**, 1993, Microcapsules for food, Journal of Microencapsulation 10 (4), p. 413–435.
- Barbosa, C. and Aguilera, JM.**, Engineering and food for the 21st century, Boca Raton: CRC Press, p. 141–150.
- Bas, D. and Boyacı, S.H.**, 2007, “Modelling and Optimization II: Comparison of Estimation Capabilities of response Surface Methodology with Artificial Neural Networks in a Biochemical Reaction”, Journal of food engineering 78, p. 846-854.
- Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E.M. and Schwarz, K.**, 2012, Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate, Journal of Food Engineering 108, p. 158–165.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bodmeier, R., Chen, H. and Paeratakul, O.**, 1989, A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 6(5), p. 413-417.
- Burnetti A., Alfano B., and Soricelli A.**, 1996, Functional characterization of brain tumord; an overview of the potential clinical value, *Nucl Med Biol*; 23, p. 699-715.
- Büyüktuncel, E.**, 2012, Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, Cilt 32, Sayı 2, s. 209-242.
- Cai, Y. Z. and Corke, H.**, 2000, Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments, *Journal of Food Science*, 65, s. 1248–1252.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J.**, 1997, Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines, *Pharmaceutical Research*, Vol. 14, No. 10.
- Canbas, A.**, 1983, Saraplarda Fenol Bilesikleri ve Bunların Analiz Yöntemleri, Tekel Enstitüleri, Yayın No: Tekel 279 EM/003, İstanbul.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A. and Galán-Vidal, C.A.**, 2009, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, p. 859–871.
- Castro, M.D.L. and Priego-Capote, F.**, 2010, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 1217(16), p. 2383.
- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. and Meireles, M.A.**, 2011, Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview, *Food Research International* 44, p. 499–509.
- Chang, YC., Huang, HP., Hsu, JD., Yang, SF. and Wang, CJ.**, 2005, Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, 205, p. 201–212.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Charron CS., Kurilich AC. and Clevidence BA.,** 2009, Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix, *J Agric Food Chem* 57, p. 1226–1230.
- Christensen, LP. and Kreutzmann, S.,** 2007, Determination of polyacetylenes in carrot roots (*Daucus carota* L.) by highperformance liquid chromatography coupled with diode array detection, *J Sep Sci* 30, p. 483–490.
- Çetin, M. ve Çapan, Y.,** 2004, Beyne İlaç Hedeflendirilmesi, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 33 (4), s. 287 - 305.
- da Costa, C.T., Nelson, B.C., Margolis, S.A. and Horton, D.,** 1998, Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 799(1–2), p. 321–327.
- de Castro, M.D.L. and Garcia-Ayuso, L.E.,** 1998, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta*, p. 369(1-2).
- De Graaf, L.A., Harmsen, P.F.H., Vereijken, J.M. and Mönikes, M.,** 2001, Requirements for non-food applications of pea proteins: A review, 45, p. 408–411.
- Deryaoğlu, A.,** 1990, Şalgam Suyu Üretimi ve Bileşimi Üzerinde Bir Araştırma, (Yüksek Lisans Tezi), Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 57.
- Donbrow M.,** 1992, *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*, Boca Raton: CRC Pres, p. 126-143.
- Doughall, D.K., Baker, D.C., Gakh, E.G., Redus, M.A. and Whitemore, N.A.,** 1998, Anthocyanins from wild carrot suspension cultures acylated with supplied carboxylic acids, *Carbohydrate Research*, 310, p. 177–189.
- Downham, A., and Collins, P.,** 2000, Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1), p. 5–22.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ersus, S. and Yurdagel, U.**, 2007, Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier, *Journal of Food Engineering* 80, p. 805–812.
- Erten, H. ve Tangüler, H.**, 2010, Fermente Bitkisel Ürünler, İçinde: *Gıda Biyoteknolojisi*, (N. Aran, editör), Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti., Ankara, s. 241-277.
- Eskilsson, C.S. and Bjorklund, E.**, 2000, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 902(1), p. 227.
- Feng, R., Ni, HM., Wang, SY., Tourkova, IL., Shurin, MR., Harada, H. and Yin, XM.**, 2007, Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress, *J Biol Chem*, 282, p. 13468–13476.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G. and Kulling, S. E.**, 2006, Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro, *European Journal of Nutrition*, 45(1), p. 7–18.
- Francis, F. J.**, 1989, Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, p. 273–314.
- Gajewski, M., Szymczak, P., Elkner, K., Dabrowska, A., Kret, A. and Danilcenko, H.**, 2007, Some aspects of nutritive and biological value of carrot cultivars with orange, yellow, and purple colored roots, *Veg Crop Res Bull* 67, p. 149–61.
- Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, NC., Tavazzi, B. and Galvano, G.**, 2004, Cyanidins: metabolism and biological properties, *J Nutr Biochem*, 15, p. 2–11.
- Gan, Q. and Wang, T.**, 2007, Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59, p. 24–34.

- Garcia-Garcia, Andrieux, K., Gil, S. and Couvreur, P.**, 2005, Colloidal carriers and blood-brain barrier(BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain, *Int J Pharm*; 298, p. 274-314.
- Garcia-Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P. and Zabetakis, I.**, 2004, The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*), *Food Chemistry*, 88, p. 7–10.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. and Mulligan, C.N.**, 1999, Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50 (3), p. 213–224.
- Giusti, MM. and Wrolstad, RE.**, 2003, Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochemical Engineering Journal*, 14, p. 217–225.
- Glei, M., Matuschek, M., Steiner, C., Böhm, V., Persin, C. and Pool-Zobel, B.L.**, 2003, Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells, *Toxicology in Vitro* 17, p. 723–729.
- Grassmann, J., Schnitzler, WH. and Habegger, R.**, 2007, Evaluation of different colored carrot cultivars on antioxidant capacity based on their carotenoid and phenolic contents, *Int J Food Sci Nutr* 58, p. 603–11.
- Gupta, A., Naraniwal, M. and Kothari, V.**, 2012, Modern Extraction Methods For Preparation Of Bioactive Plant Extracts, *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)*, Vol.1, p. 8-26.
- Gürsoy, A.Z.**, 2002, *Kontrollü Salım Sistemleri: İlaç taşıyıcı partiküler sistemler*, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, İstanbul, s.3-102.
- Hakimuddin, F., Paliyath, G. and Meckling, K.**, 2004, Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells, *Breast Cancer Res Treat*, 85, p. 65–79.
- Hawkins, R.A., O’Kane, R.L., Simpson, I.A. and Vina, J.R.**, 2006, Structure of the Blood–Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids, *The Journal of Nutrition*, 136, p. 218–226.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- He, J., Wallace, T.C., Keatley, K.E., Failla, M.L. and Giusti, M.M.**, 2009, Stability of Black Raspberry Anthocyanins in the Digestive Tract Lumen and Transport Efficiency into Gastric and Small Intestinal Tissues in the Rat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (8), p. 3141–3148.
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M. and Santos-Buelga, C.**, 1998, Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect, *Food Chemistry*, 63(4), p. 491–498.
- Huang, H. T.**, 1956, The kinetics of the decolorization of anthocyanins by fungal ‘anthocyanase’, *Journal of American Chemical Society*, 78, p. 2390–2393.
- Igarashi, K., Kimura, Y. and Takenaka, A.**, 2000, Preventive effects of dietary cabbage acylated anthocyanins on paraquat-induced oxidative stress in rats, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, p. 1600–1607.
- İyiçınar, H.**, 2007, Kontrollü Şartlarda Şalgam Suyu Üretimi Üzerine Farklı Formülasyonların Etkisi, (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, s. 57.
- Jackson, L.S. and Lee, K.**, 1991, Microencapsulation and the food industry, *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 24, p. 289–297.
- Jing, P., Bomser, J.A., Schwartz, S.J., He, J., Magnuson, B.A. and Giusti, M.M.**, 2008, Structure-Function Relationships of Anthocyanins from Various Anthocyanin-Rich Extracts on the Inhibition of Colon Cancer Cell Growth, *J. Agric. Food Chem.*, 56, p. 9391–9398.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. and Metche, M.**, 1997, Mechanism of browning in fresh Highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum*, L.). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, p. 513-516.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I. And Heinonen, M.**, 2001, Berry phenolics and their antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), p. 4076–4082.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kammerer, R., Carle, R. and Schieber, A.,** 2004, Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their colour properties, *Eur. Food Res. Technol*, 219, p. 479–486.
- Kammerer, D., Carle, R. and Schieber, A.,** 2004a, Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, p. 1331–1340.
- Kaur, C. and Kapoor, H.C.,** 2002, Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables, *International Journal of Food Science and Technology*, 37, p. 153-161.
- Kaur, IP., Bhandri, R., Bhandri, S. and Kakkar, V.,** 2008, Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting, *J of Contr Rel*; 127, p. 97-109.
- Kearsley, M. W. and Rodriguez, N.,** 1981, The stability and use of natural colors in foods: Anthocyanin,  $\beta$ -carotene and riboflavin, *International Journal of Food Science and Technology*, 16, p. 421–431.
- Kennedy, J. A., and Waterhouse, A. L.,** 2000, Analysis of pigmented high-molecularmass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 866(1), p. 25–34.
- Kesisoglou, F., Panmai, S. and Wu, Y.,** 2007, Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation, *Adv Drug Deliver Rev.*, 59, p. 631-644.
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M. and Kaur, C.,** 2011, Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color, *Food and Bioproducts Processing* 89, p. 482–486.
- Kocaefe, Ç.,** 2007, NANOTIP: yaşam bilimlerinde nanoteknoloji uygulamaları, *Hacettepe Tıp Dergisi*; 38, s. 33-38.

- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, R.**, 2003, Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry* 64, 923–933.
- Koukaras, E.N., Papadimitriou, S.A., Bikiaris, D.N. and Froudakis, G.E.**, 2012, Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate, *Mol. Pharmaceutics*, 9, p. 2856–2862.
- Kumar, D.A., Dharmendra, S., Jhansee, M., Shrikant, N. and Shiv, P.**, 2011, Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded with amoxicillin, *International Research Journal of Pharmacy*, 2 (5), p. 145-151.
- Kurilich, AC., Clevidence, BA., Britz, SJ., Simon, PW. and Novotny, J.**, 2005, Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots, *J Agric Food Chem*, 53, p. 6537–42.
- Laske, D.W., Youle, R.J. and Oldfield, E.H.**, 1997, Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors, *Nat Med*, 3(12), p. 1362-8.
- Lazcano, CA., Yoo, KS. and Pike, LM.**, 2001, A method for measuring anthocyanins after removing carotenes in purple colored carrots, *Sci Hortic-Amsterdam* 90, p. 321–324.
- Leja, M., Kaminska, I., Kramer, M., Maksylewicz-Kaul, A., Kammerer, D., Carle, R. and Baranski, R.**, 2013, The Content of Phenolic Compounds and Radical Scavenging Activity Varies with Carrot Origin and Root Color, *Plant Foods Hum Nutr*, 68, p. 163–170.
- Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R. and Young, J.C.**, Tsao, R., 2012, Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities, *Food Research International* 46, p. 250–259.
- Lien, C-Y., Chan, C-F., Lai, Y-C., Huang, C-L. and Liao, W. C.**, 2012, Ultrasound-Assisted Anthocyanin Extraction of Purple Sweet Potato Variety TNG73, *Ipomoea batatas*, L, *Separation Science and Technology*, 47:8, p. 1241-1247.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lipinski C.**, 2002, Poor aqueous solubility-an industry wide problem in drug discovery, *Am. Pharm. Rev.*, 1. 5, p. 82-85.
- Liu, Y., Murakami, N., Wang, L. and Zhang, S.**, 2008, Preparative High-Performance Liquid Chromatography for the Purification of Natural Acylated Anthocyanins from Red Radish (*Raphanus sativus* L.), *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 46.
- Liu, Y., Miyoshi, H. and Nakamura, M.**, 2007, Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles, *International Journal of Cancer*, 120(12), p. 2527-2537.
- Lopez-Avila, V.**, Sample preparation for environmental analysis, 1999, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), p. 195.
- Mahapatro, A. and Singh, D.K.**, 2011, Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines, *Journal of Nanobiotechnology*, p. 9:55.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C.**, 2005 Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr* 81(Suppl), p. 230S–42S.
- Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S.**, 2007, Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacognosy Reviews*, 1, Issue 1, p. 7-18.
- Marc R.K. and David W.W.**, 2004, Dendrimer-Mediated Formation of Multicomponent Nanospheres, *Chem. Mater.*, 16, p. 4890-4895.
- Markakis, P.**, 1982, Stability of anthocyanins in foods, In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as food colors*, New York: Academic Press Inc., p. 163–178.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K. and Terahara, N.**, 2002, Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the  $\beta$ -glucosidase inhibitory action, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, p. 7244–7248.
- Mazza, G. and Miniati, E.**, 1993, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*, Boca Raton: CRC Press.
- McGhie, TK. and Walton, MC.**, 2007, The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding, *Mol Nutr Food Res* 51, p. 702–13.
- Metivier, R. P., Francis, F. J. and Clydesdale, F. M.**, 1980, Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace, *Journal of Food Science*, 45(4), p. 1099–1100.
- Metzger, BT., Barnes, DM. and Reed, JD.**, 2008, Purple carrot (*Daucus carota* L.) polyacetylenes decrease lipopolysaccharide- induced expression of inflammatory proteins in macrophage and endothelial cells, *J Agric Food Chem* 56, p. 3554–3560.
- Mohanraj, V.J. and Chen, Y.**, 2006, Nanoparticles - A review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), p. 561-573.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods* 65(1-2), p. 55–63.
- Nanda, R., Patil, S. and Navathar, D.**, 2012, Chitosan Nanoparticles Loaded with Thiocolchicoside, *Der Pharma Chemica*, 4(4), p. 1619-1625.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D.R., Schieber, A., Carle, R., Simons, L., Bitsch, I. and Konczak, I.**, 2007, Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, p. 365–372.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW.**, 2007, Nanotechnology applications in cancer, *Annual Rev Biomed Engineer*; 9: 257-288.
- Özen, G.**, 2008, Siyah Havuç Suyu Konsantresinin Türk Lokumunda Renklendirici Olarak Kullanılması ve Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi, (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, s. 81.
- Papadimitriou, S., Bikiaris, D., Avgoustakis, K., Karavas, E. and Georgarakis, M.**, 2008, Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole, *Carbohydrate Polymers* 73, p. 44–54.
- Pifferi, P. G. and Cultrera, R.**, 1974, Enzymic degradation of anthocyanins, Role of sweet cherry polyphenol oxidase, *Journal of Food Science*, 39, p. 786–791.
- Poudyal, H., Panchal, S. and Brown, L.**, 2010, Comparison of purple carrot juice and b-carotene in a high carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome, *British Journal of Nutrition*, 104, p. 1322–1332.
- Ré, M.I.**, 1998, Microencapsulation by spray drying, *Drying Technology* 16 (6), p. 1195–1236.
- Reddivari, L., Vanamala, J., Chintharlapalli, S., Safe, SH. and Miller, JC.**, 2007, Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspaseindependent pathways, *Carcinogenesis*, 28, p. 2227–2235.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. and Veiga, F.**, 2006, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2, p. 8– 21.
- René, O.**, *Nanothermodynamics and Nanoparticle Synthesis*, NME 498A / A 2010.
- Renoe, B.**, 1994, Microwave assisted extraction, *American Laboratory*.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ribéreau-Gayon, P. and Glories Y.**, 2006, Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Edition, Wiley, p. 451.
- Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E.**, 1999, Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems, Journal of Food Science, 64, p. 451–456.
- Rostagno, M.A.; Palma, M.; Barroso, C.G.**, 2003, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, J. Chromatogr. A, 1012, p. 119–128.
- Schinor, E.C., Salvador, M.J. and Turatti, I.C.C.**, 2004, Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp., Ultrasonics Sonochemistry, 11, p. 415.
- Sevimli-Gur, C., Cetin, B., Akay, S., Gulce-Iz, S., Yesil-Celiktas, O.**, 2013, Extracts from Black Carrot Tissue Culture as Potent Anticancer Agents, Plant Foods Hum Nutr, DOI 10.1007/s11130-013-0371-z.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M.**, 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent, Methods in Enzymology, 299, p. 152-178.
- Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y. and Furuta, S.**, 2003, Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods, Japan Agricultural Research Quarterly, 37, p. 167–173.
- Sukhdev, SH., Suman-Preet, SK., Longo, G. and Rakesh, DD.**, 2008, Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International centre for science and high technology.
- Sun, T., Simon, PW. and Tanumihardjo, SA.**, 2009, Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors, J Agric Food Chem 57, p. 4142–4147.
- Svenson S and Tomalia DA.**, 2005, Dendrimers in biomedical applications reflections on the field, Adv Drug Deliv Rev, 57 p. 2106-29.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. and Rémésy, C.**, 2005, Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10), p. 3902–3908.
- Tangüler, H.**, 2010, Şalgam Suyu Üretiminde Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi Ve Şalgam Suyu Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi, (Doktora Tezi), Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 367.
- Tatke, P. and Jaiswal, Y.**, 2011, An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research, *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (1), p. 21-31.
- Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D., Steward, W. and Gescher, A.**, 2009, Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64 (1), p. 201–211.
- Tomalia, DA., Reyna, LA. and Svenson, S.**, 2007, Dendrimers as multipurpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging, *Biochem Soc Trans*, 35, p. 617.
- Turker, N., Aksay, S. and Ekiz, H.I.**, 2004, Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: shalgam, *J. Agric. Food Chem.* 52, p. 3807–3813.
- van Vlerken, LE. and Amiji, MM.**, 2006, Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3(2), p. 205-216.
- Van der Lubben, I.M., Verhoef, J.C., Borchard, G. and Junginger, H.E.**, 2001, Chitosan for mucosal vaccination, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, p. 139-144.
- Vasir, JK. and Labhasetwar, V.**, 2007, Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(8), p. 718-728.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D.**, 2008, Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, p. 161–169.
- Wan, H.B. and Wong, M.K.**, 1996, Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis, *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), p. 43.
- Wang, L. and Stoner, G.D.**, 2008, Anthocyanins and their role in cancer prevention, *Cancer Letters Natural Products Special Issue*, 269 (2), p. 281–290.
- Welch, C.R., Wu, Q. and Simon, J.E.**, 2008, Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization, *Curr Anal Chem*. April 1; 4(2), p. 75–101.
- Wesche-Ebeling, P. and Argaiiz-Jamet, A.**, 2002, Stabilization mechanisms for anthocyanin the case for copolymerization reactions. In J. Welti-Chanes.
- Wu, X., Pittman, H.E. and Prior, R.L.**, 2006, Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2), p. 583–589.
- Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J. and Fu, S.**, 2005, *International Journal of Pharmaceutics*, 295, p. 235–245.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M.**, 2002, Free radical scavenging properties of wheat extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, p. 1619–1624.
- Zhang, Y., Vareed, SK. and Nair, MG.**, 2005, Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables, *Life Sci*, 76, p. 1465–1472.

[http://www.rndsystems.com/molecule\\_group.aspx?g=3280&r=7&g2=3279](http://www.rndsystems.com/molecule_group.aspx?g=3280&r=7&g2=3279)

(Erişim tarihi: 15 Haziran 2014)

<http://neuroscience.uth.tmc.edu/s4/chapter11.html> (Erişim tarihi: 28 Mayıs

2014)



## ÖZGEÇMİŞ

2012 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden mezun oldu. 2012 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Katıldığı projeler; Kara havuç bitkisinden farklı yöntemler ile antosiyanin eldesinin optimizasyonu, enkapsülasyonu ve Neuro 2A kanser hücre hattına etkisinin incelenmesi (Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir (113M196) ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan 'levodopa' kimyasalının enkapsülasyonu için formülasyon geliştirilmesi ve karakterizasyon testleri (Bilimsel Araştırma Projesi).

Bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler ve posterler;

- Pala, C., Çetin-Uyanıkgil, E., Yeşil-Çelikaş, Ö., Neuro 2-A Hücre Hattına Karşı Etkin Olan Kara Havuç Ekstresinin Sol-gel ile Enkapsülasyonu, Türkiye İnovasyon Haftası, 29-30 Mayıs 2014, İzmir (poster bildirisi).
- Pala, C., Kırılmaz, L., Çetin-Uyanıkgil, E., In Vitro L-Dopa Tayini İçin Gradient Dad-Uplc Yöntemi Geliştirilmesi, Ulusal Kromatografi Kongresi, 12-15 Mayıs, İzmir (poster bildirisi).
- Pala, C., Sevimli-Gür, C., Çetin-Uyanıkgil, E., Yeşil-Çelikaş, Ö., Antosiyaninlerce Zengin Kara Havuç Ekstrelerinin Neuroblastoma Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Aktiviteleri, Celal Bayar Üniversitesi 2. Ulusal Sağlık Bilimleri Kongresi, 17-20 Nisan 2014, Manisa (sözlü sunum).
- Pala, C., Muller, C., Ubeaud, G., Peluso, J., Cytotoxicity test and flow cytometry analysis of different plants using SW 620 colonic cancer cell line, Strasbourg Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 31 Ocak 2014, Strasbourg, Fransa (sözlü sunum).
- Pala, C., Sevimli-Gür, C., Çetin-Uyanıkgil, E., Yeşil-Çelikaş, Ö., Cytotoxic Activity Of Anthocyanin Rich Black Carrot Extract On Neuro 2A Cell Line, 6. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi, 12-15 Kasım 2013, Kuşadası (sözlü sunum).