BİTKİSEL VE MİKROALG İÇERİKLİ KREMLERİN GELİŞTİRİLMESİ, ANTİOKSİDAN VE ANTİ-TİROSİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Eftal Alp DORKEN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL VE MİKROALG İÇERİKLİ KREMLERİN GELİŞTİRİLMESİ, ANTİOKSİDAN VE ANTİ-TİROSİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Eftal Alp DORKEN
0000-0003-3120-3233

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA–2022
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİSEL VE MİKROALG İÇERİKLİ KREMLERİN GELİŞTİRİLMESİ, ANTİOKSİDAN VE ANTİ-TİROSİNAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN ANALİTİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Eftal Alp DORKEN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Bu tez kapsamında, *Zingiberaceae* familyasına ait *Alpinia officinarum* (havlıcan) için ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve ekstraktlarda bulunan fenolik maddeler, kantitatif olarak HPLC-DAD (yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör) ile belirlenmiştir. Ayrıca hazırlanan dört farklı polaritedeki (%80 etanol, %80 metanol, %50 etanol ve %50 metanol) ekstraktlarda bulunan toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri de belirlenmiştir. En yüksek galangin içeriği olan %80 etanol ekstraktı kullanılarak kolon kromatografisi ile ekstrakttan galangin saflaştırılmıştır. Daha sonra galangin betasiklodekstrin ile enkapsule edildikten sonra, galangin-betasiklodekstrin kalıntısı, sodyum aljinat ve $CaCl_2$ kullanılarak hidrojel yapımında kullanılmıştır. Maksimum galangin salınımı için galangin-aljinat hidrojelini oluşturma koşulları merkezi kompozit dizayn yöntemi ile optimize edilmiştir. ANOVA analiz sonuçlarına göre sodyum aljinat yüzdesi %0,69 (w/v); $CaCl_2$ yüzdesi %1 (w/v); zaman 43,55 (dk); ekstrakt yüzdesi %0,48 (w/v) olarak bulunmuştur. Bu değerler ile yapılan hidrojelden elde galangin salınım derişimi, tahmini değer ile uyumlu bulunmuştur. Elde edilen galangin-aljinat hidrojelinin FT-IR ve SEM ile yapısal karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır. Mikroalg olarak *Chlorella vulgaris* örneği de ekstrakte edilip, antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra galangin-betasiklodekstrin kalıntısı, *C.vulgaris* kalıntısı ve galangin-aljinat hidrojeli krem örneklerine de eklenerek, kremlerin antioksidan özellikleri ve antitirosinaz etkileri de incelenmiştir. Çalışmamızda hazırlanan krem örneklerinin aday örnekler olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Havlıcan, *Chlorella vulgaris*, hidrojel, antioksidan, mikroalg, krem, tirosinaz
2022, ix+84 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DEVEPLOPMENT OF CREAM INCLUDING PLANT AND MICROALGAE INVESTIGATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTI-TYROSINASE ENZYME ACTIVITIES BY ANALYTICAL METHODS

Eftal Alp DORKEN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

With in the scope of this thesis, an extraction method was developed for *Alpinia officinarum* (galangal) belonging to the *Zingiberaceae* family, and the phenolic substances in the extracts were quantitatively determined by HPLC-DAD (high performance liquid chromatography-diode series detector). In addition, the total phenolic substance and antioxidant capacity values in the extracts of four different polarities (80% ethanol, 80% methanol, 50% ethanol and 50% methanol) were determined. Galangin was purified from the extract with column chromatography by using 80% ethanol extract including the highest galangin content. Subsequently, after galangin was encapsulated with betacyclodextrin, the residue of galangin-betacyclodextrin was used in hydrogel making by using sodium alginate and $CaCl_2$. For maximum galangin release, the conditions for forming galangin-alginate hydrogel were optimized by the central composite design method. According to the ANOVA analysis results, the percentage of sodium alginate was 0.69% (w/v); percentage of $CaCl_2$ 1% (w/v); time 43.55 (min); extract percentage was found to be 0.48% (w/v). The galangin release concentration obtained from the hydrogel made with these values was found to be compatible with the estimated value. Structural characterization studies of the obtained galangin-alginate hydrogel were also performed with FT-IR and SEM. As microalgae *Chlorella vulgaris* sample was also extracted and its antioxidant properties were determined. Subsequently, galangin-betacyclodextrin residue, *C. vulgaris* residue and galangin-alginate hydrogel were added to the cream samples, and the antioxidant properties and antityrosinase effects of the creams were also investigated. It was concluded that the cream samples prepared in our study could be candidate samples.

Key words: Galangal, *Chlorella vulgaris*, hydrogel, antioxidant, microalgae, cream tyrosinase
2022, ix+84 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans başlangıcından bitimine kadar olan stresli süreçte her motivasyon kaybı yaşadığımda beni motive eden, yardımını esirgemeyen, bilgi ve birikimini paylaşan saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Saliha ŞAHİN'e

Tez dönemi boyunca bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocam Dr. Önder AYBASTIER'e

Yüksek lisans deneysel çalışmalarım boyunca bana yardım ve destekleriyle yardım eden laboratuvar arkadaşlarım Büşra KARKAR, Gizem BAYAÇLI ve İlkyaz PATIR'a

Tez dönemi boyunca her çıkmaza girdiğimde yanımda olan desteğini ve sevgisini eksik etmeyen eşim Cansu SEVEN DORKEN'e

Beni bugünlere getiren iyi günde kötü günde hep yanımda olan sevgili annem Alime DORKEN ve babam Ercüment DORKEN'e

Hayatım boyunca örnek aldığım desteğini hiç esirgemeyen, eğitim gördüğüm süre zarfında bana maddi ve manevi destek olan rahmetli abim Cenk DORKEN'e

TEŞEKKÜR EDERİM

Eftal ALP DORKEN
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....vii
1. GİRİŞ..... 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....3
2.1. Fenolik Bileşikler.....3
2.1.1. Fenolik Asitler.....3
2.1.2. Flavonoidler.....7
2.2. Polifenolik İçerikli Ürünler.....7
2.3. Kozmetik ürünleri.....8
2.4. Kremlerin Önemi ve Özellikleri.....10
2.5. Hidrojeller.....12
2.6. Aljinat.....14
2.7. Havlıcan Bitkisi ve Önemi.....15
2.8. Galangin.....18
2.9. Antitirosinaz İnhibisyonu.....22
2.10. Yüzey Analiz teknikleri.....28
2.11. *Chlorella vulgaris*.....28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....33
3.1. Materyal.....33
3.1.1. Tez Kapsamında Çalışılan Bitki Materyali.....33
3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar.....33
3.1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar.....34
3.1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Sarf Malzemeler.....35
3.1.5. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltiler.....35
3.2. Yöntem.....38
3.2.1. Örnek Hazırlama İşlemleri.....38
3.2.2. Spektroskopik Yöntemler.....39
3.2.3. Kromatografik Yöntemler.....41
3.2.4. HPLC-DAD cihazı ile karotenoidlerin kantitatif analizi.....41
3.2.5. Saflaştırma Çalışmaları.....42
3.2.6. Kemometrik Çalışmalar.....45
3.2.7. Anti-tirosinaz enzim aktiviteleri.....48
4. BULGULAR.....50
4.1. Spektroskopik Sonuçlar.....50
4.2. Kromatografik Sonuçlar.....50
4.3. Saflaştırma Çalışmaları.....52
4.4. Kemometrik Çalışmalar.....55
4.5. Anti-tirosinaz enzim aktivite çalışmaları.....63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....65
5.1. Spektroskopik Yöntemler.....65
5.2. Kromatografik Yöntemler.....67
5.3. Saflaştırma çalışmaları.....67
5.4. Kemometrik Yöntemler.....68

5.5. Anti-tirosinaz enzim aktivite çalışmaları 72
KAYNAKLAR 74
ÖZGEÇMİŞ 84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
%	Yüzde oranı
nm	Nanometre
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
mg/L	Miligram/Litre
mg/g	Miligram/gram
cm	Santimetre
m	Metre
dk	Dakika
L	Litre
μL	Mikrolitre
M	Molarite
Rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV-VIS	Ultraviyole/Görünür bölge
UV	Ultraviyole
LOD	Tayin limiti
LOQ	Tespit limiti
DAD	Diyot seri dedektör
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
CCD	Merkezi kompozit dizayn
N	Toplam deney sayısı
w/v	Hacimce ağırlıkça yüzde
v/v	Hacim yüzde
w/w	Kütlece yüzde
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Fenol bileşiğin yapısı 3
Şekil 2.2. Hidroksisinnamik asit türevlerinin yapıları 5
Şekil 2.3. Hidroksibenzoik asitlerin yapıları 6
Şekil 2.4. Hidroksisinnamik asitlerin yapıları 6
Şekil 2.5. Flavonoidlerin yapıları (R grupları fonksiyonel gruplardır) 7
Şekil 2.6. Sodyum aljinat yapısı 14
Şekil 2.7. Yumurta kafes modeli (Kabaş 2006) 15
Şekil 2.8. Havlıcan bitkisi (*Alpinia officinarium*) (Ding ve ark. 2019) 15
Şekil 2.9. Galangin yapısı 18
Şekil 2.10. Galanginin başlıca metabolik oluşumu (Mak ve ark. 2018) 19
Şekil 2.11. Melanin sentez reaksiyonu (Bronze-Uhle ve ark. 2016) 23
Şekil 2.12. Kozmetikte kullanılan beyazlatıcı etken maddelerin bazıları 25
Şekil 2.13. Karotenoidlerin kimyasal yapıları 30
Şekil 2.13. Karotenoidlerin kimyasal yapıları (devam) 31
Şekil 2.13. Karotenoidlerin kimyasal yapıları (devam) 32
Şekil 3.1. Havlıcan bitkisinin ekstraksiyon yöntemi 38
Şekil 3.2. Kolon metodu ile fenolik maddelerin saflaştırılması (etanol ve metanol) 42
Şekil 3.3. Havlıcanlı yüz kreminin hazırlanışı 43
Şekil 3.4. Toplam fenol ve antioksidan kapasite ölçümleri için krem örneklerinin hazırlanışı 43
Şekil 3.5. *Chlorella vulgaris* ekstraksiyon aşamaları 44
Şekil 3.6. *Chlorella vulgaris* ekstraktlı krem 44
Şekil 3.7. Havlıcan ekstraktının enkapsülasyonu 45
Şekil 3.8. Hidrojellerin elde edilişi 46
Şekil 3.9. Salınım testinin HPLC analiz için hazırlanışı 47
Şekil 3.9. Salınım çalışması için analiz şeması 47
Şekil 3.10. Şişme oranı testi için analiz şeması 47
Şekil 4.1. 320 nm'de etanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği 52
Şekil 4.2. 360 nm'de etanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği 52
Şekil 4.3. 320 nm'de metanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği 53
Şekil 4.4. 360 nm'de etanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği 53
Şekil 4.5. Havlıcanlı yüz kremi 54
Şekil 4.6. *Chlorella vulgaris* krem formu 55
Şekil 4.7a. Kemometrik yüzey analizi grafikleri (Zaman- $CaCl_2$ etkisi) 57
Şekil 4.7b. Kemometrik yüzey analizi grafikleri (Zaman-Ekstrakt etkisi) 58
Şekil 4.8. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının görüntüsü 59
Şekil 4.9. Hidrojel görüntüsü 59
Şekil 4.10. Sodyum aljinat, ß-siklodekstrin+havlıcan ekstraktı, ß-siklodekstrin ve hidrojelin FTIR spektrumları 60
Şekil 4.11. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının SEM görüntüsü (500 büyütme) 60
Şekil 4.12. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının SEM görüntüsü (1000 büyütme) 61
Şekil 4.13. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının SEM görüntüsü (3000 büyütme) 61
Şekil 4.14. Hidrojel SEM görüntüsü (200 büyütme) 62
Şekil 5.1. Galangin-aljinat hidrojelinin hazırlanması 69
Şekil 5.2. β-siklodekstrin yapısı 70
Şekil 5.3. Siklodekstrinlerin 3 boyutlu yapıları (Zhang ve Rees 1999) 70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Fenolik antioksidanların sınıflandırılması (Shahidi ve Ambigaipalan 2015) 4
Çizelge 2.2. Fenolik maddelerin kullanım alanları 8
Çizelge 2.3. Kozmetikte kullanılan hammaddelerin özellikleri (Baki ve Alexander 2015, Salvador ve Chisvert 2007) 9
Çizelge 2.4. Kozmetik ürünler ve kullanım nedenleri (Bakı ve Alexander 2015, Salvador ve Chisvert 2007) 9
Çizelge 2.4. Kozmetik ürünler ve kullanım nedenleri (Bakı ve Alexander 2015, Salvador ve Chisvert 2007) (devam) 10
Çizelge 2.5. Kremlerin kullanım amaçları 11
Çizelge 2.6. Fenolik bileşiklerin krem formülasyonlarındaki kullanımı (Soto ve ark. 2015) 11
Çizelge 2.7. Hidrojellerin uygulama alanları (Sop 2013) 12
Çizelge 2.8. Hidrojellerin sınıflandırılması (Akalın 2011, Ulusoy ve Dikmen 2020) 13
Çizelge 2.9. Hidrojel avantajları ve dezavantajları (Ekmen 2019) 14
Çizelge 2.10. Havlıcan bitkisinin yerel isimleri 16
Çizelge 2.11. Havlıcan bitkisinin kullanıldığı hastalıklar (Zhang ve ark. 2020) 16
Çizelge 2.12. Havlıcan köksapında bulunan uçucu yağ içerikleri (Rana ve ark. 2010) 17
Çizelge 2.13. Havlıcan bitkisinde bulunan flavonoid ve türleri (Ding ve ark. 2019) 17
Çizelge 2.14. Galanginin biyolojik aktieleriyle ilgili geleceğe yönelik çalışmalar (Mak ve ark. 2018) 21
Çizelge 2.15. Beyazlatıcı ajanların tayinleri 27
Çizelge 2.16. *Chlorella vulgaris* içeriğinde bulunan bileşenler (Nasir ve ark. 2017) 29
Çizelge 3.1. Cihaz özellikleri ve kullanım amaçları 33
Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar 34
Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar (devam) 35
Çizelge 3.3. Analizlerde kullanılan sarf malzemeler 35
Çizelge 3.4. Folin-Ciocalteu kalibrasyon verileri 39
Çizelge 3.5. ABTS kalibrasyon verileri 40
Çizelge 3.6. CHROMAC kalibrasyon verileri 40
Çizelge 3.7. HPLC çalışma programı 41
Çizelge 3.8. HPLC çalışma programı 42
Çizelge 3.9. Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri 45
Çizelge 3.10. Gerçek seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn tablosu 45
Çizelge 3.10. Gerçek seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn tablosu (devam) 46
Çizelge 3.11. IC50 değerleri belirlenecek örnekler ve kullanıldığı miktarlar 48
Çizelge 3.12. A, B, C ve D çözelti hacimleri 49
Çizelge 3.13. %İnhibisyon kalibrasyon verileri 49
Çizelge 4.1. Spektroskopik bulgular 50
Çizelge 4.2. HPLC-DAD için hazırlanan fenolik maddelerin kalibrasyon grafikleri 51
Çizelge 4.3. Havlıcan ekstraktlarında bulunan fenolik madde miktarları 51
Çizelge 4.4. Spektroskopik bulgular 54
Çizelge 4.5. Kemometrik deneysel ve tahmini değerler 56
Çizelge 4.6. Kemometrik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları 56
Çizelge 4.7. Kuadratik polinom denklemleri (x_1:Na-Al yüzdesi (%w/v), x_2:$CaCl_2$ yüzdesi (%w/v), x_3:Zaman (dk), x_4:Ekstrakt yüzdesi (%w/v)) 57

Çizelge 4.8. Kemometrik optimum koşullar ve deneysel/tahmini değerler 57
Çizelge 4.9. Şişme oranları 63
Çizelge 4.10. Örneklerin IC50 değerleri 64
IC50 Değeri (mg/mL) 64
Çizelge 5.1. Siklodekstrinlerin yardımcı madde olarak kullanım alanları 70

1. GİRİŞ

Yaşamımız boyunca maruz kaldığımız genetik faktör, UV ışığı ve çevresel faktörlerin cildimize doğrudan veya dolaylı temas etmesi sonucu, vücudumuzda pigmentasyon bozukluklarına neden olmaktadır. Melanin pigmentlerinin sentezinde düzensizlikler meydana gelerek ciltte ton uyuşmazlığı, lekeler ve izler meydana gelmektedir. Dermokozmetik krem formunda satılan ürünlerin etken maddesi olarak sentetik bazlı kimyasalların tercih edilmesi ve uzun süre kullanımlar sonucu canlılarda bazı yan etkiler olabilmektedir. Yan etkileri azaltmak amacıyla günümüzde etken özellik olarak fenolik ve flavonoid içeriği yüksek bitkisel ağırlıklı dermokozmetik ürünler ön plana çıkmaktadır.

Havlıcan, çok yıllık bir bitki ve 1000 yıldan uzun süre Çin ve Avrupa bölgelerinde baharat olarak tüketilmiş, zengin fenolik ve flavonoid içeriğine sahip zencefil familyasına ait bir bitki türüdür. Havlıcan keskin kokulu ve odunsu bir yapıya sahiptir. Baharat olarak kullanmak için birkaç işlemden geçirilerek toz kıvamına getirilir. Havlıcan besin öğelerine bakıldığında %5,25 protein, %76,9 karbohidrat, %2,26 yağ, %17 ham lif ve eser miktarda elementlerden oluşmaktadır. Havlıcanın antienflamatuar, antioksidan, antiemetik ve antikanser özelliklere sahiptir.

Chlorella vulgaris yağ asitleri, pigment, steroller, vitaminler, mineral, antioksidanlar, karbohidrat ve fenolik maddelerce zengin olması nedeniyle piyasada takviye edici gıda ve kozmetik ürün olarak kullanılmaktadır. *Chlorella vulgaris* besin kaynağı olarak %51-58 protein, %12-17 karbohidrat ve %14-22 yağ içermesi nedeniyle takviye edici gıdalarda diyet için önemli bir tercih nedeni olmuştur. *Chlorella vulgaris* içeriğinde bulunan diğer önemli grup ise karotenoidlerdir.

Kozmetik, canlıların güzelleşmek daha iyi bir görünüme sahip olmak, cilt kusurlarını kapatmak veya tedavi için tercih edilen cilt bakım ürünleridir. Kozmetik tarihi M.Ö. 4000 yıllarında mısırlılara dayanmaktadır. O zamanlarda da insanlar görünümlerine özen göstermekte saç, yüz ve göz çevresini farklı renkte boyalar ile boyamaktadırlar. Gözlere sürdükleri boyaların güneşin zararlı etkilerinden korumak amaçlı kullanıldığı düşünülmektedir. M.Ö. 2000 yıllarında Mezopotamya'da bitkilerden ve baharatlardan

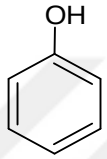
ilaç, kozmetik ve boyaların hazırlandıkları ve kınalar ile saç boyamaya başladıkları bilinmektedir. M.Ö. 500'lerde Hint uygarlığında kozmetik ürünlerin üretiminde tütsü, sandal ağacı ve değişik kokular kullanılmaya başlanmış, Çinli kadınlar ise yüz bakımı için çay yağı ve pirinç tozu maskesi kullanmıştır (Sungur ve ark. 2018). Geçmişten günümüze kadar kozmetik hayatımızın hep bir köşesinde bizimle beraber olmuştur. Günümüzde ise sentetik ürünlerin yerine doğal içerikli bileşiklerin kullanılması hem insan sağlığı hem de çevre kirliliği açısından daha çok tercih edilmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda bitkisel ve mikroalg içerikli krem geliştirilip, antioksidan ve anti-tirosinaz enzim aktivitelerinin analitik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Tez kapsamında *Chlorella vulgaris* ve havlıcandan elde edilen ekstraktların antioksidan özellikleri kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Daha sonra ilgili ekstraktlardan fenolik madde ve karotenoid saflaştırılması yapılmıştır. İzole edilen fraksiyonlar krem formulasyonuna eklenerek, kremin antioksidan ve antitirosinaz inhibisyon özellikleri incelenmiştir. Ayrıca galangin-alginat hidrojellerinin hazırlanması için merkezi kompozit dizayn yöntemiyle optimizasyon yapılmıştır. Optimum koşullarda hazırlanan galangin-aljinat hidrojeli krem formuna eklenerek antioksidan ve antitirosinaz inhihisyon özellikleri belirlenmiştir. Hazırlanan galangin-aljinat hidrojelinin yapısal karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fenolik Bileşikler

Benzen halkasına bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren bileşiklere fenolik bileşikler veya polifenoller adı verilir. En basit fenolik yapı (Şekil 2.1) bir benzen halkasına bağlı hidroksil grubunun bulunduğu yapı olup, diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir. Fenolik antioksidanlar, kökenlerine göre sentetik ve doğal olarak sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1).



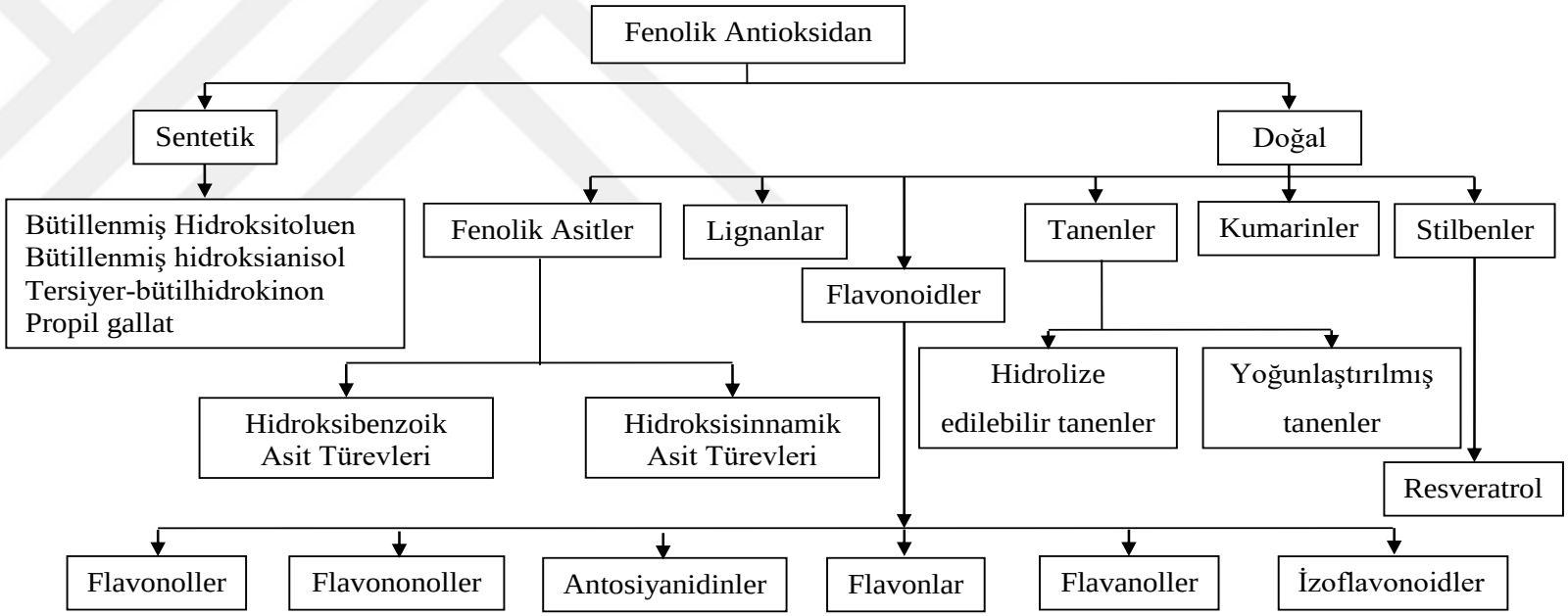
Şekil 2.1. Fenol bileşiğin yapısı

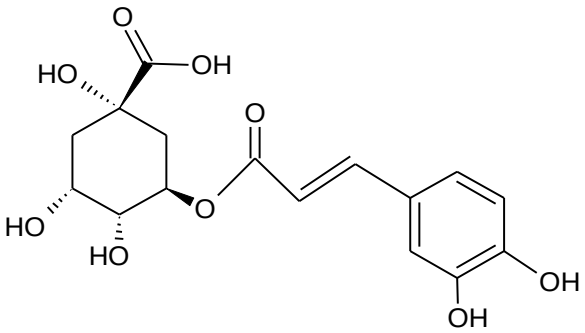
Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler zararlı hayvan ve güneş ışınlarından, parazitlerden, mantarlardan, mikroorganizmalardan ve olumsuz çevre şartlarından bitkinin korunmasını sağlamaya çalışırlar. Fenolik antioksidanların sınıflandırılması Çizelge 2.1'de verilmiştir.

2.1.1. Fenolik Asitler

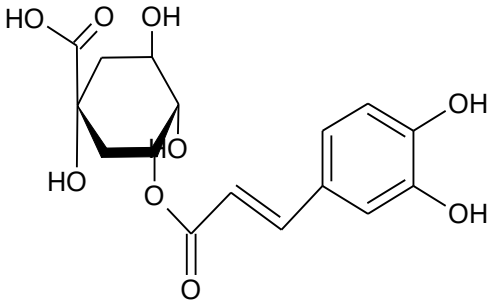
Fenolik asitler bitkilerde sekonder metabolit olarak bulunurken az miktarda da doğada serbest olarak bulunurlar. Bitkilerin rengi, tadı ve kokusundan sorumludurlar. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit türevleri fenolik asitleri oluştururlar. Hidroksisinnamik asit türevlerinden en yaygınlarından bazıları; klorojenik asit, neo-klorojenik asit, izoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit ve kaftarik asitlerdir (Şekil 2.2). Hidroksibenzoik asitler, en basit yapılı fenolik bileşiği olan fenol bileşiğine karboksil gruplarının bağlanmasıyla oluşan yapılardır. *p*-hidroksibenzoik asit, gallik asit ve protokatekuik asit örnek olarak verilebilir (Şekil 2.3).

Çizelge 2.1. Fenolik antioksidanların sınıflandırılması (Shahidi ve Ambigaipalan 2015)

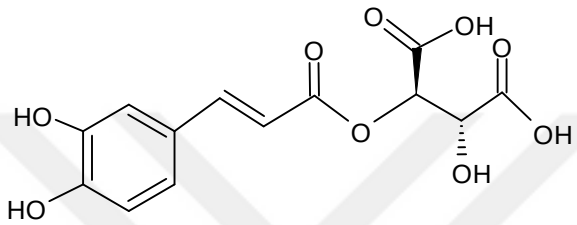




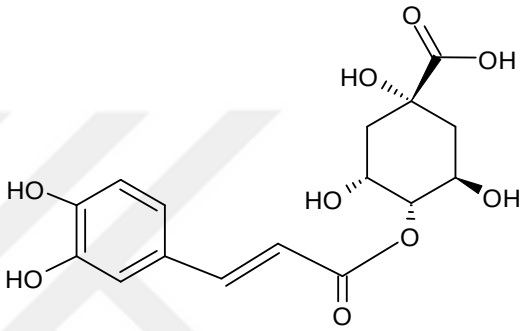
Klorojenik asit



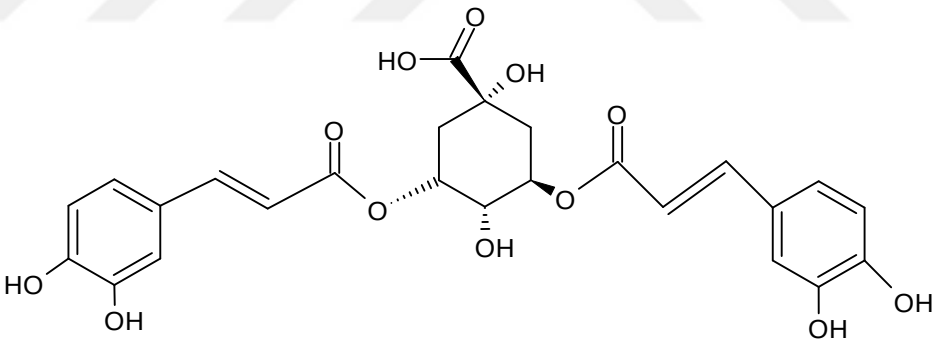
Neo-klorojenik asit



Kaftarik asit



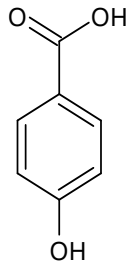
Kriptoklorojenik asit



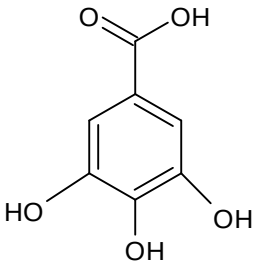
İzoklorojenik asit

Şekil 2.2. Hidroksisinnamik asit türevlerinin yapıları

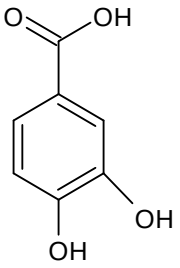
Fenolik asitleri oluşturan hidroksisinnamik asitlerin en yaygın olarak bilinen yapılarından bazıları; *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, izoferulik asit ve sinapik asitler olduğu bilinmektedir (Şekil 2.4).



p-hidroksibenzoik asit

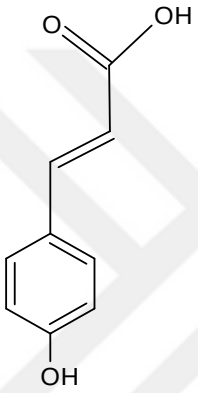


Gallik asit

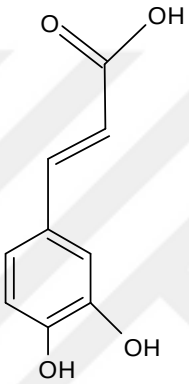


Protokatekuik asit

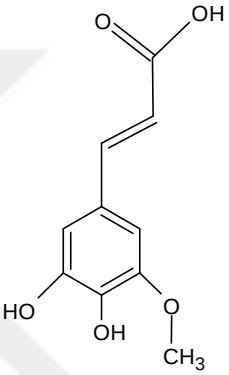
Şekil 2.3. Hidroksibenzoik asitlerin yapıları



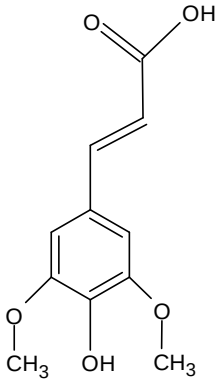
p-kumarik asit



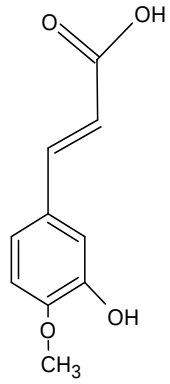
Kafeik asit



Ferulik asit



Sinapik asit

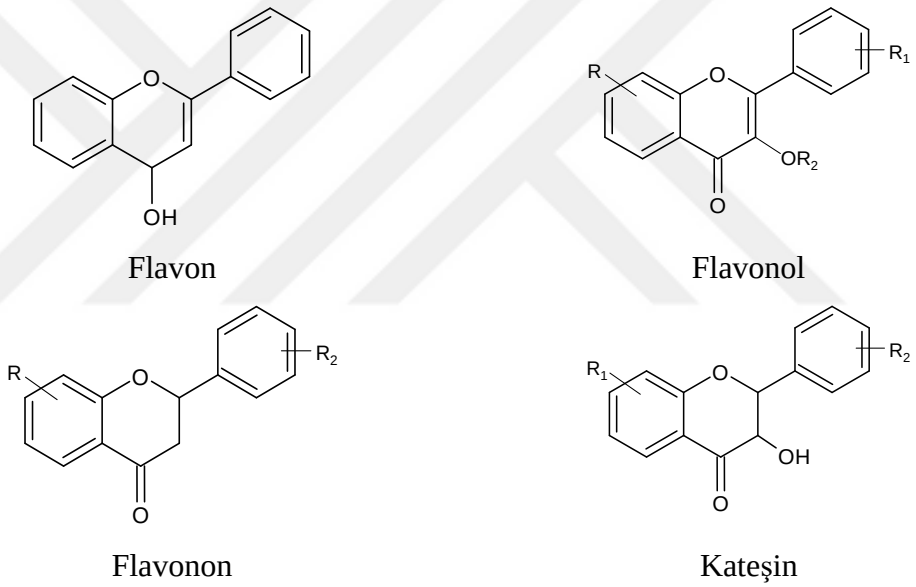


İzoferulik asit

Şekil 2.4. Hidroksisinnamik asitlerin yapıları

2.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler canlı sağlığı açısından günümüzde çok önemli bir yere sahiptir. Bitkiler ve meyvelerde çok fazla bulunmaktadırlar. Serbest radikaller; daha çok canlı yapıdaki organ, doku zedelenmesi, yararlı hücrelerin işlevselliğinin engellenmesini sağlayarak, DNA ve RNA yapılarını bozarak insan vücuduna zarar veren yapılardır. Flavonoidler, serbest radikaller ile reaksiyon gerçekleştirip, onların zararsız hale dönüştürülmesini sağlayan güçlü antioksidanlardır. Serbest radikal süpürme özelliği dışında antimikrobiyal, antiradyasyon, immünomodülatör, antifungal ve antiinflamatuar özellikleriyle de bilinirler. Flavon, flavonol, flavanol, flavonon ve katesin flavonoid olarak bilinen yapılardır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Flavonoidlerin yapıları (R grupları fonksiyonel gruplardır)

2.2. Polifenolik İçerikli Ürünler

Fenol bileşikler takviye edici gıdalarda, gıda ürünlerinde ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır. Takviye edici gıdaların içinde etken madde olarak yani insan için gerekli olan mineral ve vitaminlerin eksikliğinde kullanılmaktadır. Kozmetik ürünlerinde daha çok spesifik rahatsızlıklara uygun fenolik etken maddeler tercih edilmektedir. Kremler, makyaj malzemeleri, nemlendiriciler vb. gibi kozmetik ürünlerin asıl işlevini sağlayan etken madde fenolik bileşiklerdir. Doğal veya sentetik olarak elde

edilebilmektedirler. Doğal olarak fenoller meyve ve sebzelerde bulunurlar. Kozmetik formülasyonlarına ilaveleri için ön işlemlerden geçirilerek uygun hale getirilirler. Fenolik içeren ürünler yapısındaki antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antiviral özelliklerinden dolayı kozmetik ürünlerinde tercih edilmektedir. Bitmiş ürünün içeriği fenol dışında vitaminler ve mineraller ile zenginleştirilmektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Fenolik maddelerin kullanım alanları

Fenolik ürün	**Kullanım Alanı**	**Kaynak**
Yaban mersini	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Hui ve ark. 2021, Schiavon ve ark. 2019
Vitamin C	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Cercamondi ve ark. 2013, Zerbinati ve ark. 2021
Vitamin B3	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Final Report of the Safety Assessment of Niacinamide and Niacin, 2005
Vitamin E	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Juncan ve ark. 2019, Waniek ve ark. 2018
Koenzim Q10	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Pegoraro ve ark. 2017, Petrangolini ve ark. 2019
Hyaluronik asit	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Janik-Hazuka ve ark. 2020, Torreao ve ark. 2021
Böğürtlen	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Correa ve ark. 2021
Siyah frenk üzümü	Kozmetik ürünleri,	Çağlar ve Demirci 2017, May ve Guenther 2020, Skrede ve ark. 2000
Ahududu	Kozmetik ürünleri, gıda takviyeleri	Oh ve ark. 2020, Wu ve ark. 2018

2.3. Kozmetik ürünleri

Kozmetik, belirli koşullar ve şartlar altında en az iki veya daha fazla üründen elde edilen kişisel temizlik, cilt sorunlarını giderme veya bakım amaçlı kullanılan opak/şeffaf görünümlü ürünlerdir. Kozmetikler gaz, sıvı ve krem formunda olabilir. Ürünü oluşturan hammaddelerin karakteristik özellikleri vardır. Bunlardan bir kısmı Çizelge 2.3'de verilmiştir. Kozmetik sanayisi geçmişten günümüze kadar sürekli gelişip büyümektedir. Bunun en büyük sebepleri insanların sürekli kusurlarını kapatıp güzelleşmeye olan isteklerinden kaynaklanmaktadır. Canlılar kozmetik ürünlerini güzelleşmenin yanı sıra cilt rahatsızlıklarının tedavisi içinde tercih etmektedirler.

Kozmetik ürünleri ve kullanım nedenlerinden bazıları Çizelge 2.4'de verilmiştir. Kozmetik ürünler insanların sağlık ve cilt bozukluğu sorunlarından dolayı önem kazanmıştır. İnsanların daha güzel bir görünüme kavuşmak adına olan uğraşlarının sonucunda daha kusursuz, daha parlak cilde olan ilgileri kozmetik sektörünün parlamasının nedenlerinden biridir.

Çizelge 2.3. Kozmetikte kullanılan hammaddelerin özellikleri (Baki ve Alexander 2015, Salvador ve Chisvert 2007)

Kullanılan hammade	**Özelliği**
Kıvamlaştırıcılar	Su gibi akışkan özellikteki yapının içerisinde şişerek viskoz krem formuna dönüştürülmesinde kullanılan ürünlerdir
Etken maddeler	Canlılarda sağlık sorunlarını (pigmentasyon, güneş yanıkları, mantar vb) tedavi etmek için kullanılan kozmetik formülasyonlarında bulunan maddelerdir. Güneş kremleri/losyonlarında kullanılan UV filtreler örnek verilebilir
Emülgatörler	Birbiri ile karışmayan su ve yağ formundaki maddelerin belirli oranlarda karışmasını sağlayan maddelerdir
Koruyucular	Bitmiş kozmetik ürünlerinin içerisinde üreme oluşmasını engelleyen maddelerdir
Esans	Bitmiş kozmetik ürünlerindeki kokuların kaynağıdır
Boya	Bitmiş ürünlerin renklerini belirlemekte kullanılır
Estetik modifiye ajan	Daha çok bitmiş ürünlerin bulanıklığını gidermek için kullanılan opaklaştırıcı ajanlardır
Nemlendiriciler	Cilt sıvı dengesini ve ısıyı düzenleyerek cildin gerekli nemi tutmasını sağlamaktadırlar

Çizelge 2.4. Kozmetik ürünler ve kullanım nedenleri (Bakı ve Alexander 2015, Salvador ve Chisvert 2007)

Kozmetik Ürünler	**Kullanım nedenleri**
Ruj	Dudakları nemlendirir ve renklendirir
Oje	Tırnakların kırılmasını önler ve renklendirir
Peeling	Cildin dış tabakasındaki ölü deri hücrelerinin soyulmasını sağlayarak cildin yenilenmesi sağlanır
Parfüm ve deodorant	Terlemede oluşan kötü kokuların giderilmesinde kullanılır
Güneş kremleri	Zararlı güneş ışınlarının ciltte olan zararlarının engellemesinde kullanılır

Çizelge 2.4. Kozmetik ürünler ve kullanım nedenleri (Bakı ve Alexander 2015, Salvador ve Chisvert 2007) (devam)

Kremler (el,ayak ve yüz)	Kuru ciltlerin nemlendirilmesinde ve kötü çevre koşullarında ciltte bariyer oluşturarak çatlamasını engellemek için kullanılır
Losyon	Vücudun gerekli nem dengesini ve cildin yumuşaklık sağlaması amacıyla kullanılır.
Şampuan	Saç temizliğinde kirlerin uzaklaştırılmasında kullanılır
Pudra	Ciltteki kusurları kapatmak için kullanılır
Tonik	Gün boyu kirlenen cildin temizlenmesi için kullanılır
Maskara	Kirpiklerin belirginleştirmesi ve koyulaştırması için kullanılır
Saç boya	Saç, kaş ve bıyıkların renklendirilmesinde kullanılır
Mantar kremi	Mantar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır
Çatlak kremi	Aşırı kilo alıp vermekten kaynaklanan çatlakların tedavisinde kullanılır
Kırışıklık giderici krem	İlerleyen yaşlarda oluşan kırışıklıkların giderilmesinde kullanılır.

2.4. Kremlerin Önemi ve Özellikleri

Kremler kozmetik ürün çeşitliliğinin en önemli payına sahip ürünlerden biridir. Kremler birden fazla hammadde karışımından oluşan genellikle opak görünüme sahip yapılardan oluşur. Kremler insan sağlığı açısından çok önemli bir yere sahip olmasının insan zihnini ve bedenini rahatlamasından kaynaklanmaktadır. Kullanım için seçilecek ürünlerin cilt tipine ve kullanım alanına uygun seçilmelidir. Kremlerin kullanımı açısından bakarsak insan vücudunun rahatlaması, nemlendirilmesi, saç köklerin güçlendirilmesi, kırışıklık giderilmesi, pigmentasyon bozuklukların giderilmesi, zararlı güneş ışınlarına karşı cildin korunması vb. gibi birçok özellik, kremlerin içeriğindeki etken maddelere bağlıdır. Dünya üzerinde binlerce farklı formülasyona sahip farklı yapıda kremler bulunmaktadır. Kullanım alanına göre kremler Çizelge 2.5'de gösterilmiştir. Kozmetik ürünler dışında dermatoloji, tıp ile kozmetik kelimesinden türeyen dermokozmetik insan sağlığı açısından önemlidir. Kozmetik cilt bakımı güzelleşmek için kullanılırken, dermokozmetik ise daha çok cilt hastalıklarının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Polifenolik maddelerin kozmetik ürünlerdeki kullanımı oldukça yaygındır (Çizelge 2.6). Bunun nedeni içeriğindeki antioksidan maddeler

sayesinde reaktif oksijen türlerine ve UV ışınlarına karşı vücudun savunmasını destekleyerek kullanım amacına uygun yerlerde olumlu gelişmeler göstermesidir.

Çizelge 2.5. Kremlerin kullanım amaçları

Krem çeşidi	**Amacı**
Masaj kremi	Ağrıyan bölgeyi rahatlatmak amacıyla kullanılan kremlerdir. İçeriğinde besleyici yağlar dışında fresh maddeler ile vücudun rahatlaması sağlanır (Law ve ark. 2008)
Leke kremi Beyazlatıcı krem	Cilt üzerindeki leke, akne, ton uyuşmazlığı, deri hastalıklarında kullanılır (Kim ve ark. 2011)
Nemlendirici krem	Kuru cilte sahip kişiler vücut nem dengesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Alam ve ark. 2020)
Peeling	Cilt temizleme ve kapalı gözenekleri açmak için kullanılmaktadır (Dorgham ve ark. 2020)
Anti-aging krem	Yaşlanma sonrası ortaya çıkan kırışıklıkların giderilmesinde kullanılmaktadır (Astuti ve ark. 2021)
Güneş kremi	Güneşin zararlı ışınlarından cildin korunması için koruyucu bariyer oluşturmak için kullanılır (Torbati ve Javanbakht 2020)
Mantar kremi	Cilt hastalığı olarak bilinen mantarların tedavisinde kullanılmaktadır (Taofiq ve ark. 2016)
Çatlak kremi	Genel olarak kuru ciltlerde el ve ayak bölgelerinde sıklıkla görülen çatlakların giderilmesinde kullanılmaktadır (Zhu ve Kannan 2020)
Pişik kremi	Genellikle ıslak ve hava almayan bölgelerde oluşumuna engel olması için kullanılmaktadır (Garcia Bartels ve ark. 2014)

Çizelge 2.6. Fenolik bileşiklerin krem formülasyonlarındaki kullanımı (Soto ve ark. 2015)

Bileşik	**Aktivite**	**Kozmetik kullanım**
Gallik asit, kateşin, epikateşin, konjuge flavonoidler, proantosiyanidinler, resveratrol, melanin	Antioksidan, radikal temizleyici, hücre büyümesinin uyarılması	Yaşlanma karşıtı koruyucu
Ferulik asit, kafeik asit, gallik asit, resveratrol, proantosiyanidinler	Işın koruyucu	Güneş koruyucuları, dudak koruyucuları
Tartarik asit	Peeling, karartıcı, pH düzenlemesi	Kimyasal ve fiziksel peeling ajanı, kararma önleyici, pH düzeltici
Oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, vitamin C, vitamin E	Antioksidan, besleyici	Gece ve gündüz kremi (yaşlanma karşıtı)

2.5. Hidrojeller

Hidrojel, birbirine çapraz bağlı polimerlerin oluşturduğu büyük karmaşık yapılardır. Suda çözünmeyen yapılardır. Sulu ortamlarda suyun bir kısmını yapı içerisinde tutarak şişer dolayısıyla kütle ve hacmi doğru oranda artar. Hidrojeller hacimlerinin 100 katı kadar şişebilir, kuru ortamda suyu dışarı salarak tekrar eski hacimlerine dönebilir. Doğal ve sentetik olarak bulunabilirler. Hidrojellerin suda çözünmemelerinin nedeni kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmalarından kaynaklanmaktadır. Fiziksel çapraz bağlar, Van der waals etkileşimleri ve hidrojen bağları gibi bağların kristal yapıyla zayıf etkileşimleri olabilir (Shapiro 2011). Çapraz bağlar ağ yapısını ve fiziksel bütünlüğü sağlarlar. Günümüzde kullanım alanları önem kazanmıştır. Akıllı polimer olarak bilinen hidrojeller ile kontrollü ilaç salınımının vücut içerisinde taşınarak kontrollü olarak istenilen bölgede salınması üzerine çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda akıllı polimerlerin sıcaklık, pH, basınç, nem, elektriksel alan ve manyetik alan gibi çevresel etkilere karşı cevap verebilme özelliğinden yararlanılmıştır (Ahmed 2015). Akıllı polimerlerin çevresel etkilere hızlı tepkime vermesi uygulama alanlarında önem kazanmasını arttırmıştır (Çizelge 2.7).

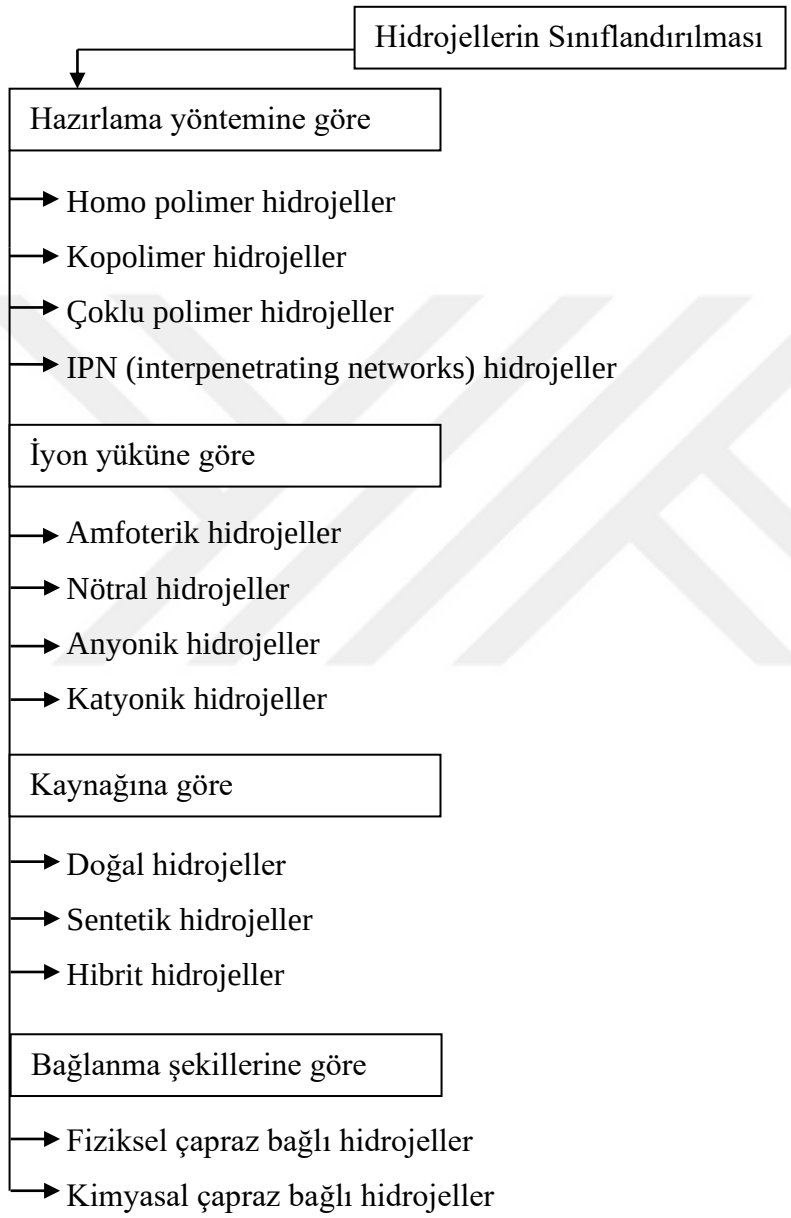
Çizelge 2.7. Hidrojellerin uygulama alanları (Sop 2013)

Uygulama Alanı	**Hidrojel**
Yara örtüsü	Poliüretan, polivinilpirolidon, polietilen glikol, metil selüloz, karboksimetil selüloz, aljinat
İlaç taşınımı	Polivinilpirolidon, poliakrilik asit, karboksimetil selüloz, polivinil alkol, akrilik asit, metakrilik asit, 2-akrilo,2-metil sülfonik asit, kitosan
Diş malzemesi	Hidrokolloidler
Doku mühendisliği, implantlar	Polivinil alkol, poliakrilik asit, hyalüronan, kollajen
Enjekte edilebilir polimer sistemler	Poliesterler, polipeptitler, kitosan
Kozmetik, farmasotik uygulamalar	Arap zamkı, pektin, kitin, kitosan, heparin, nişasta, aljinat

Hidrojellerin sınıflandırılması hazırlama yöntemine göre, iyon yüküne göre, kaynağına göre ve bağlanma şekline göre Çizelge 2.8'de verilmiştir. Hidrojeller kullanım alanlarına göre seçilmeli veya sentezlenmeleri gerekmektedir. Hidrojellerin avantajları

ve dezavantajları düşünüldüğünde (Çizelge 2.9) karşılaştırılma yapılması gerekiyorsa diğer alternatif ürünlere yönlenmelidir.

Çizelge 2.8. Hidrojellerin sınıflandırılması (Akalın 2011, Ulusoy ve Dikmen 2020)

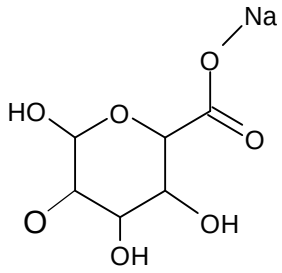


Çizelge 2.9. Hidrojel avantajları ve dezavantajları (Ekmen 2019)

Avantajları	**Dezavantajları**
Biyouyumludurlar	Sterilize etmek zordur
Hücrelerden kolaylıkla geçebilirler	Mekanik etkiye karşı zayıftırlar
Hücre ligandlarıyla kolayca modifiye edilebilirler	İlaç yüklenmesi ve in *vitro* olarak bağ oluşumu zordur
Vücut sıcaklığında sıvı formda enjekte edilebilirler	Bazı durumlarda kullanımları zordur (Ermiş 2007).
Sulu ortamdan hücreleri ve dayanıklı olmayan ilaçları koruyabilirler (Ermiş 2007).	Maliyetlidir

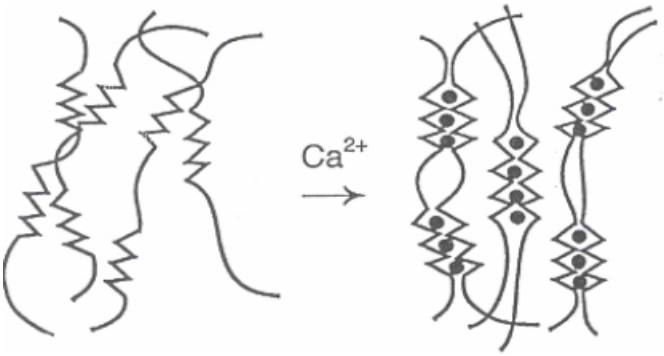
2.6. Aljinat

Aljinatlar kahverengi deniz yosunlarından elde edilen şelatlama özellikleri bulunan aljinik asitin sodyum tuzu (Şekil 2.6) formudur. Sodyum aljinatlar daha çok soğuk su bölgelerinde yetişip gelişen, kahverengi deniz yosunlarından elde edilmektedir. Aljinik asit, 1,4-glikosidik bağlantılar ile birleştirilen β-D-mannuronik asit ve α-L-glukuronik asit kalıntılarından oluşan doğrusal bir blok kopolimer polisakkarittir (Doğrusoy 2018). Soğuk ve sıcak su ortamında yüksek düzeyde aljinasyon etkisi sayesinde çözünme kabiliyetine sahiptir. Ortamda kalsiyum olması durumunda katalizör olmasa bile jel oluşturma yeteneğine sahiptir.



Şekil 2.6. Sodyum aljinat yapısı

Jelleşmenin oluşumuna etki eden onun zayıf yada daha kuvvetli yapısının oluşmasına, pH, iyonik güç, sıcaklık, aljinat konsantrasyonu, ortam koşulları, bağ yapısı vb. faktörlere bağlıdır. Aljinatın katyonlarla güçlü çapraz bağlanma etkileşimleri şu şekilde sıralanır; +3 değerlikli katyonlar> Pb^{2+}> Cu^{2+}> Cd^{2+}> Ba^{2+}> Sr^{2+}>Ca^{2+}. Kalsiyum iyonu etkileşim gücü düşük olmasına rağmen en çok tercih edilip kullanılandır. Jel oluşurken kalsiyum ile aljinat arasında iyon değişimi gerçekleşir, kalsiyum iyonları aljinattaki karboksil ve hidroksil gruplarıyla yumurta-kafes (Şekil 2.7) yapısını oluşturur.



Şekil 2.7. Yumurta kafes modeli (Kabaş 2006)

2.7. Havlıcan Bitkisi ve Önemi

Havlıcan, zencefil familyasına ait keskin kokulu aromatik bir bitki türüdür. Rizomları 1-2 cm kalınlığında ve kırmızı renklidir. Boyları yaklaşık olarak 3 metreye kadar uzanabilen çiçekli, çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.8). Tropik bölgelerde yetişir. Yetiştiği bölge ve iklim koşullarına göre farmakolojik fonksiyonlar üzerinde etkileri farklılık göstermektedir. Avrupa ve Çin'de 1000 yılı aşkın süredir baharat olarak kullanılmaktadır. Havlıcan bitkisi güneydoğu Asya, Çin'in belli bölgeleri, Hindistan ve Laosta yetişmektedir (Lin ve ark. 2015, Rana ve ark. 2010).



Şekil 2.8. Havlıcan bitkisi (*Alpinia officinarium*) (Ding ve ark. 2019)

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki havlıcanın, antiinflamatuar, antioksidan (Srividya ve ark. 2010), antiemetik (Shin ve ark. 2002) ve antikanser (Ding ve ark. 2019) olduğunu göstermiştir. Havlıcan köksapında %5,25 protein, %76,9 karbohidrat, %2,26 yağ, %15 ham lif ve çeşitli eser miktarda elementler içerir (Indrayah ve ark. 2009). Ayrıca

bölgelere göre havlıcan bitkisinin bir kaç yerel ismi vardır (Çizelge 2.10). Havlıcan bitkisinin günümüzde tedavi amaçlı kullanıldığı diğer hastalıklar Çizelge 2.11'de gösterilmiştir. Uçucu yağlar, tüm bitkinin %1,5'ini oluşturan köksaptaki ana bileşenlerden biri olarak havlıcan aromasına katkıda bulunur.

Çizelge 2.10. Havlıcan bitkisinin yerel isimleri

Lokal adı	**Ülke**	**Kaynak**
Gao linang jiang	Çin	Salgado ve ark. 2007
Heha	Çin	Pei 1985
Chitrarathai chooranam	Hindistan/Tamil	Abubakar 2018
Aichhia or Dum aidu	Hindistan/Mizoram	Sharma ve ark. 2001
Khoulanjan	İran	Fard ve Shojaii 2013, Rezaei ve ark. 2015
Ryokyo	Japonya	An ve ark. 2008
Khoudenjal	Fas	Jamila ve Mostafa 2014
Kulanja	Yemen	Fleurentin ve Pelt 1982
Havlıcan	Türkiye	Güzel ve ark. 2015
Kha Ling	Tayland	Lim 2015
Petite galangal	Fransız	Lim 2015
Galanga	Hollanda	Lim 2015

Çizelge 2.11. Havlıcan bitkisinin kullanıldığı hastalıklar (Zhang ve ark. 2020)

Bitki	**Tedavisinde kullanılan hastalıklar**
Havlıcan	Diyabet
	Yüksek kan basıncı
	Deri hastalıkları
	Bağırsak kanseri
	Karın ağrısı
	Yaşlanma
	Romatizma ve eklem ağrıları
	Dizanteri

Yağlarda GC-MS ile yapılan çalışmalarda 75 bileşik tanımlanmıştır ve ana bileşenler (Çizelge 2.12) aşağıda verilmiştir. Havlıcan köksapındaki uçucu yağlar, serum azot monoksit seviyesini ve mide mukozasının mikro sirkülasyonunu iyileştirebilir. Oksijen serbest radikallerini ortadan kaldırıp mukoza bariyerini güçlendirerek anti-gastrik ülser aktivitesi göstermiştir (Gao ve ark. 2016).

Çizelge 2.12. Havlıcan köksapında bulunan uçucu yağ içerikleri (Rana ve ark. 2010)

Havlıcan kök sapındaki yağlar	% İçerik
1,8-sineol	28,3
α-fenkil asetat	15,2
Karotol	8,9
α-terpineol	6,7
α-eudesmol	4,5
Ê-metilsinnamat	4
Kamfor	3,4
ß-pinen	3,1
Kamfen	2,3
Borneol	1,7
Eprinen-4-ol	1,2
α-pinen	1,2

Çizelge 2.13. Havlıcan bitkisinde bulunan flavonoid ve türleri (Ding ve ark. 2019)

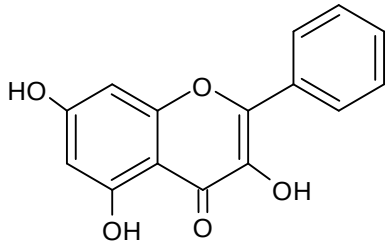
Flavonoidler türü	Flavonoidler
Flavonoid aglikon	Galangin
	Galangin-3-metileter
	Kamferol
	Kamferol-4-metileter
	Kuersetin
	Kuersetin-3- metileter
	Apigenin
	Isorhamnetin
	Ramnositrin
	Pinocembrin
	7–hidroksi-3,5-dimetoksiflavon
	Dihidrogalanginol
	Kateşin
Flavonoid glikozit	Galangin-3-β- D-glukozit
	Kamferol-4’ -metileter-3-β-d-glukozit

Parfüm, ilaç, oda spreyi, losyon ve kozmetik ürünlerin hazırlanmasında da kullanılabilir. Flavonoidler, flavonoid aglikonlar ve glikozitler havlıcanın ana kimyasal yapılarından biridir. Havlıcan üzerindeki araştırmalarda bulunan izole edilmiş flavonoid ve türleri Çizelge 2.13’de verilmiştir. Flavonoidler, canlılarda bulunan serbest radikallerin üretimini inhibe ederek azalmasını sağlar ve serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemesini sağlayan güçlü bir antioksidandırlar (Köse ve ark. 2015). Ayrıca galanginle ilgili diğer araştırmalarda tümör oluşumunu engellemesi ve antitümör proliferasyonu gibi çoklu antikanser etkileri olduğu gözlenmiştir (Tolomeo ve ark.

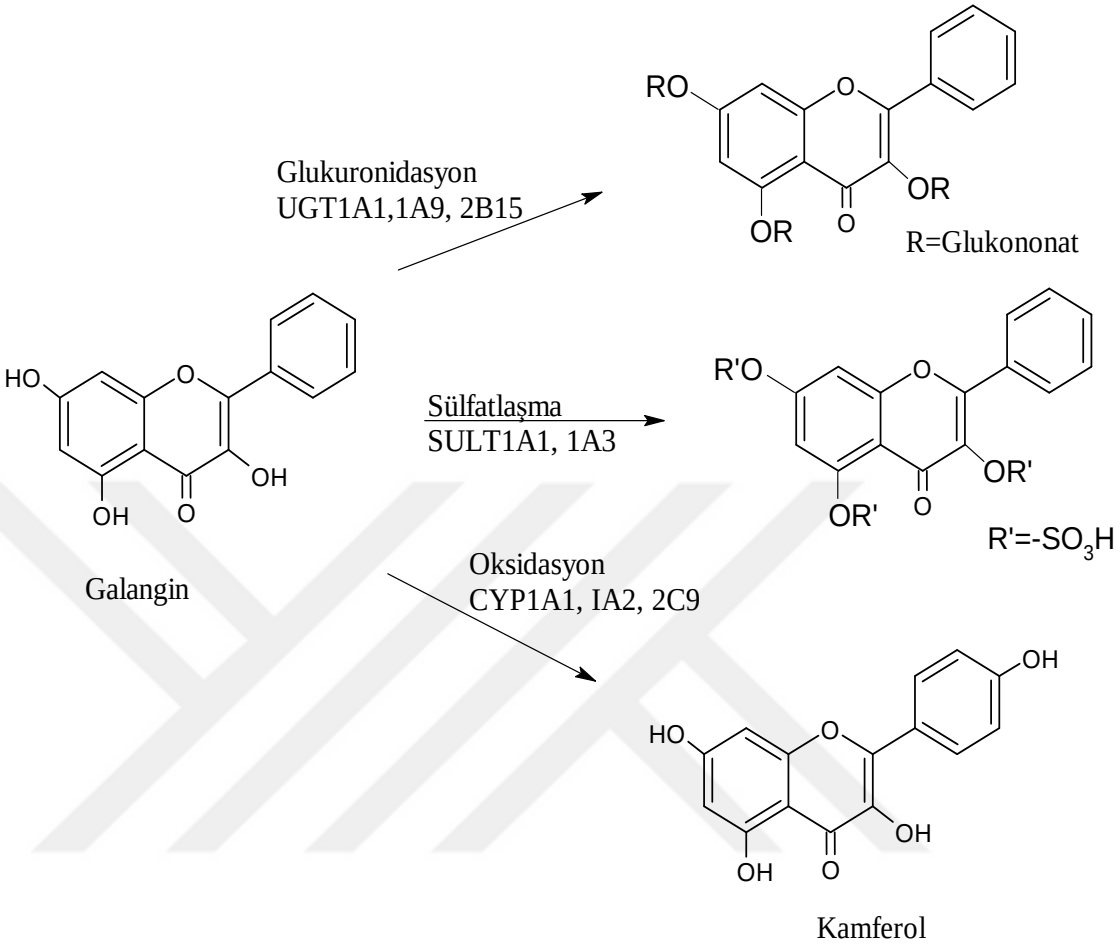
2008). Diarilheptanoidler, havlıcanın ana yapısında bulunan karakteristik bileşenlerden biridir. Havlıcan köksapı üzerinde yapılan çalışmalarda şimdiye kadar 48 diarilheptanoid bileşiği izole edilmiştir. Bunlardan 43 tanesi lineer diarilheptanoid, üç-siklik diarilheptanoid ve bir diarilheptanoid taşıyan flavonol kısmıdır (Ding ve ark. 2019). Havlıcanda bulunan diarilheptanoidler çeşitli biyoaktiveteler göstermiştir; B16 melanom hücrelerinin neden olduğu melanogenezi inhibisyonu, indüklenen apoptoz inhibisyonu, S-fazı inhibisyonu, insan lökotrienlerin biyoesentez inhibisyonu, proinflamatuar mediatör inhibisyonudur. Diarilheptanoidler bazı virüslere karşı (influenza virüsü, solunum sinsityal virüsü, çocuk felci virüsü, kızamık virüsü, herpes simpleks virüsü, tip 1 çocuk felci virüsü) antiviral biyoaktivite gösterdiği belirlenmiştir (Sawamura ve ark. 2010a, Sawamura ve ark. 2010b). Havlıcan rizomunun metanollü eksktraktlarından dokuz glikozit ve yedi fenilalanin bileşiği izole edilmiştir (Ly ve ark. 2002, Ly ve ark. 2003). Havlıcan rizomu üzerinde yapılan diğer çalışmalarda seskiterpenler, monoterpenler, organik asitler ve laktonların varlığı gözlenmiştir (Ding ve ark 2019). Havlıcan köksapında çinko, mangan, demir, magnezyum, kalsiyum ve temel eser miktarda elementlerin varlığı da tespit edilmiştir (Ding ve ark 2019).

2.8. Galangin

Havlıcan ve ölmez çiçek bitkilerinin ana bileşeni olarak bulunmaktadır. Galangin (Şekil 2.9), flavonollerin kimyasal sınıfına aittir. Zayıf asidik bileşiktir, suda kolay çözünmez. Kuersetin, kamferol, morin ve myrisetin türü flavanoidler arasında en lipofilik bileşiktir (Imamura ve ark. 2000). Asya kültüründe uzun zamandır diyabet, ishal, öksürük, mide ve bağırsak hastalarında kullanılan halk ilacı olarak bilinmektedir (Zhang ve ark. 2013). Kimyasal yapısına bakıldığında antimutajenik, enzim düzenleyici ve antioksidan etkilere sahiptir (Heo ve ark. 2001).



Şekil 2.9. Galangin yapısı



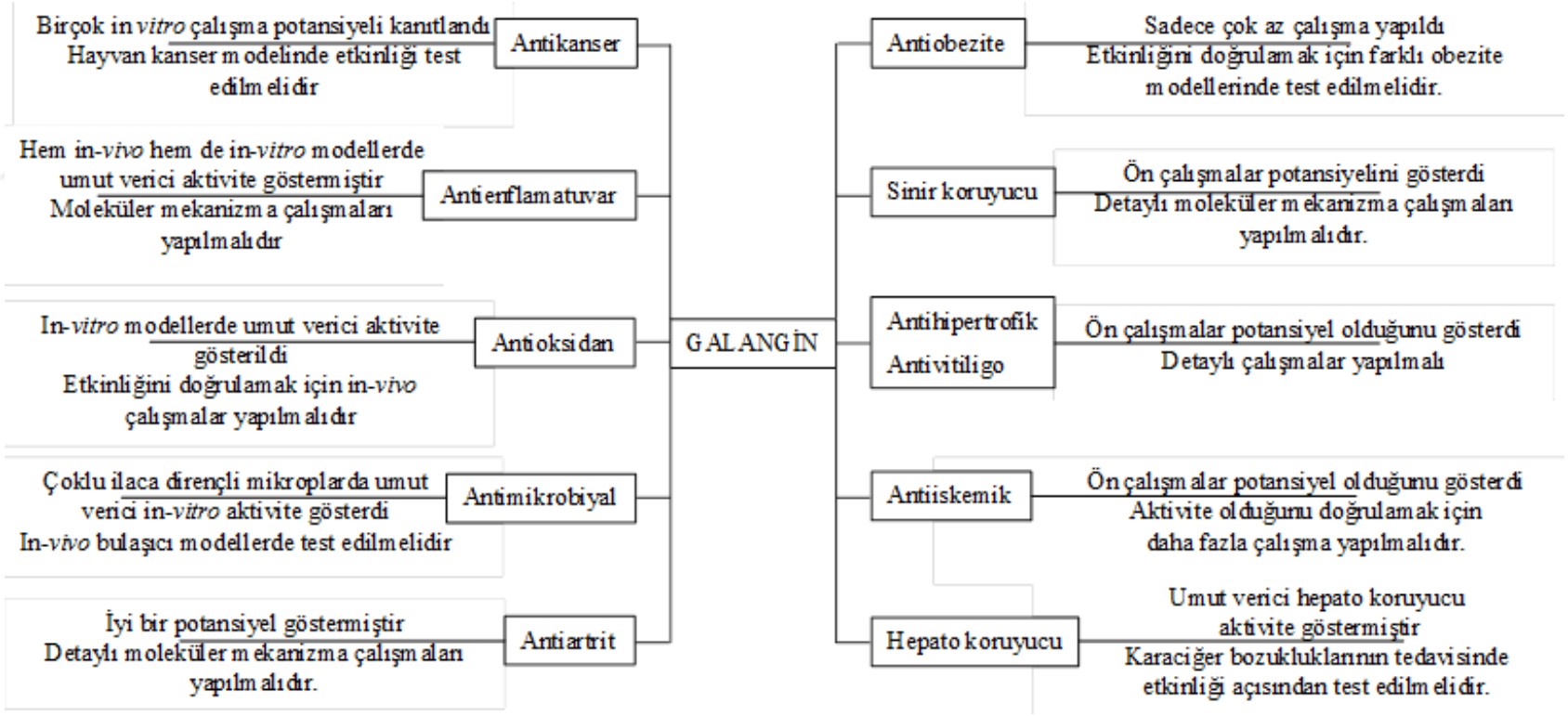
UGT: Üridin 5'-difosfo (UDP)-glukuroniltransferaz
SULT: Sülfotransferaz
CYP: Sitokrom P450

Şekil 2.10. Galanginin başlıca metabolik oluşumu (Mak ve ark. 2018)

Galanginin metabolik yolları Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Galangin metabolizması tercihen 3,5 ve 7 hidroksil grubunun sülfatlanması ve oksidasyonu ile glukuronidasyon yolu ile gerçekleşir. Glukuronidasyon, UDP-glukoroniltransferaz (UGT)1A9, UGT1AI ve UGT2B15 enzimleri tarafından katalize edilir. Sülfatasyon, tüm sülfotransferaz (SULT) izoformları tarafından ancak tercihen SULT1AI ve SULT1A3 izoformları tarafından katalize edilir. Oksidasyon, sitokrom P450 (CYP450) enzimi, özellikle CYP1A1, CYP1A2 ve CYP2C9 tarafından katalize edilir (Chen ve ark. 2015, Mak ve ark. 2018, Otake ve ark. 2002). Galangin metabolizmaya uğradığı için oral

biyoyararlanımda çok az miktarda serbest haldedir. Galangin, yapısal androstan reseptörünün (CAR) dolaylı aktivasyonu yoluyla CYP450 enzimlerini indükler (Carazo Fernández ve ark. 2015) (Şekil 2.10). Galangin ve oksitlenmiş metaboliti kamferol, CYP1A1 yapısını inhibe eder. Pasif difüzyon sırasında galangin, galangin sülfat ve kamferolden daha fazla absorpsiyona sahiptir (Barrington ve ark. 2009). Dünya çapında birçok araştırmacı galanginin potansiyel biyolojik aktiviteleri ve havlıcan bazı özellikleri (antikanser, antienflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antiartrit, antiobezite, nöroprotektif, antihipertrofik, antivitiligo, anti-iskemik ve hepatoprotektif özellikler) üzerinde çalışmaları bulunmaktadır. Aynı zamanda galangin biyolojik aktivitelerini ve potansiyelini doğrulamak için fonksiyonel gıda maddesi olarak kullanılabilirliği de araştırma konuları olmuştur (Çizelge 2.14) .

Çizelge 2.14. Galanginin biyolojik aktieleriyle ilgili geleceğe yönelik çalışmalar (Mak ve ark. 2018)



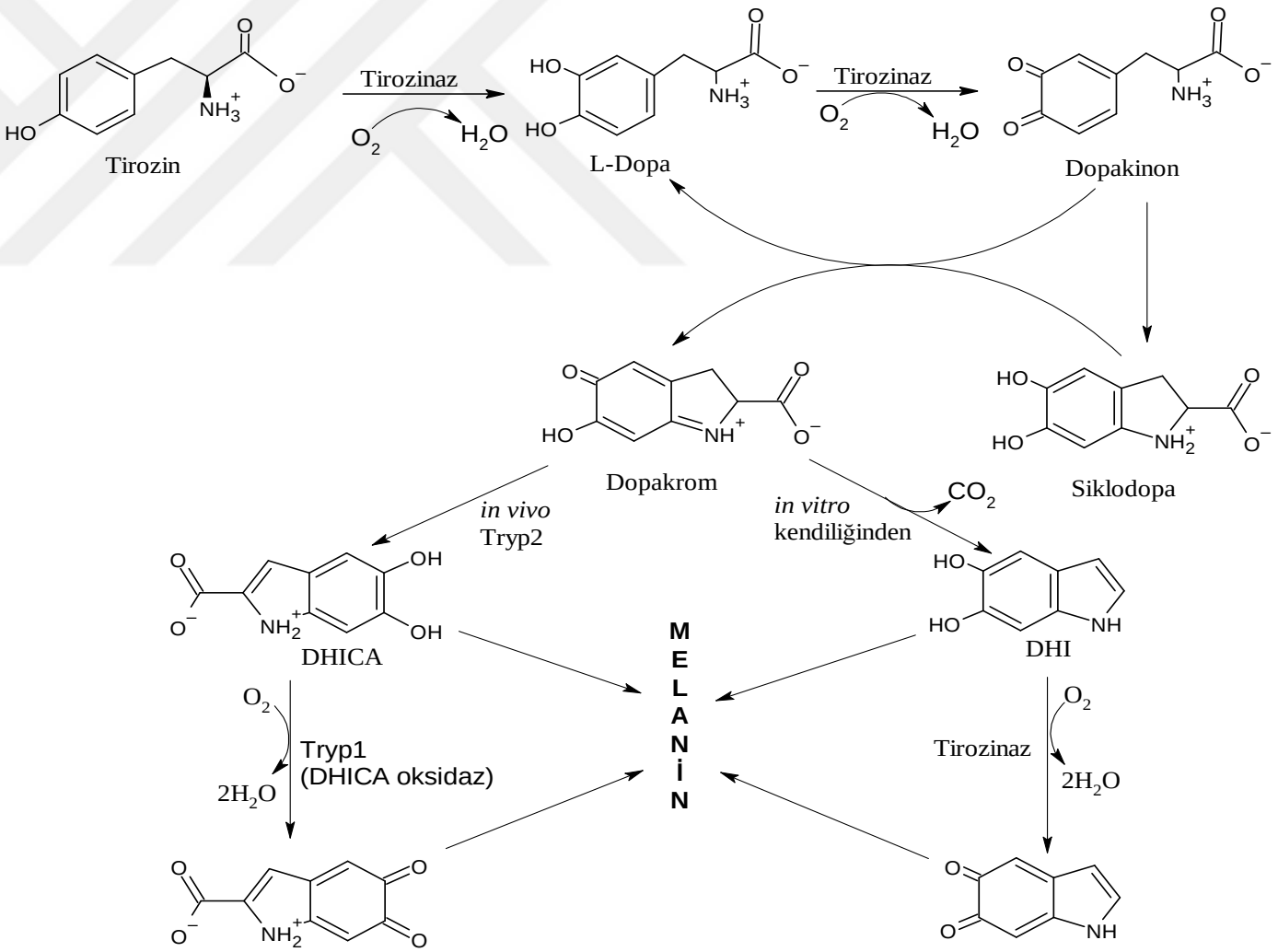
2.9. Antitirosinaz İnhibisyonu

Tirosinaz, melanin biyosentezinde kilit görev alan içeriğinde bakır içeren, deri ve saç rengini belirleyen enzimdir. Pigmentasyon, melanin hücrelerin gereğinden fazla veya az sentezlenmesinde kaynaklı cilt hastalıklarına neden olmaktadır. Melanin alt birimi olan feomelanin ve eumelanin karışımları saç, cilt ve gözlerin renk tonlarını belirler. Melanin sentezi, tirosinaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonda amino asit tirozinin l-3,4-dihidroksifenilalanine hidroksilasyonu ile başlar.

Melanin sentezine neden olan etkenler;

- Melanin sentezini gerçekleştiren melanositlerin miktarı
- Genetik faktör
- UV ışığı ve çevresel faktörler
- Melanojenik aktivite
- Melanin tipi
- Melanozomların büyüklüğü, sayısı ve dağılımı
- Deri pigmentasyonu

Melanin hiperpigmentasyonu ile ilişkili deri hastalıklarının tedavisinde tirosinaz inhibisyonunun klinik olarak kullanımı söz konusudur. Ayrıca kozmetikte cilt rengini açma etkisi ile de önem arz etmektedir. Tirosinaz aktivitesini inhibe etmek için kojik asit gibi birçok sentetik inhibitör geliştirilmiş olmasına rağmen bunların uzun periyotta toksik etkilerinin bulunması, alternatif olarak doğal inhibitörlerin belirlenmesine yönelik çalışmaları hızlandırmıştır (Tocco ve ark. 2009).

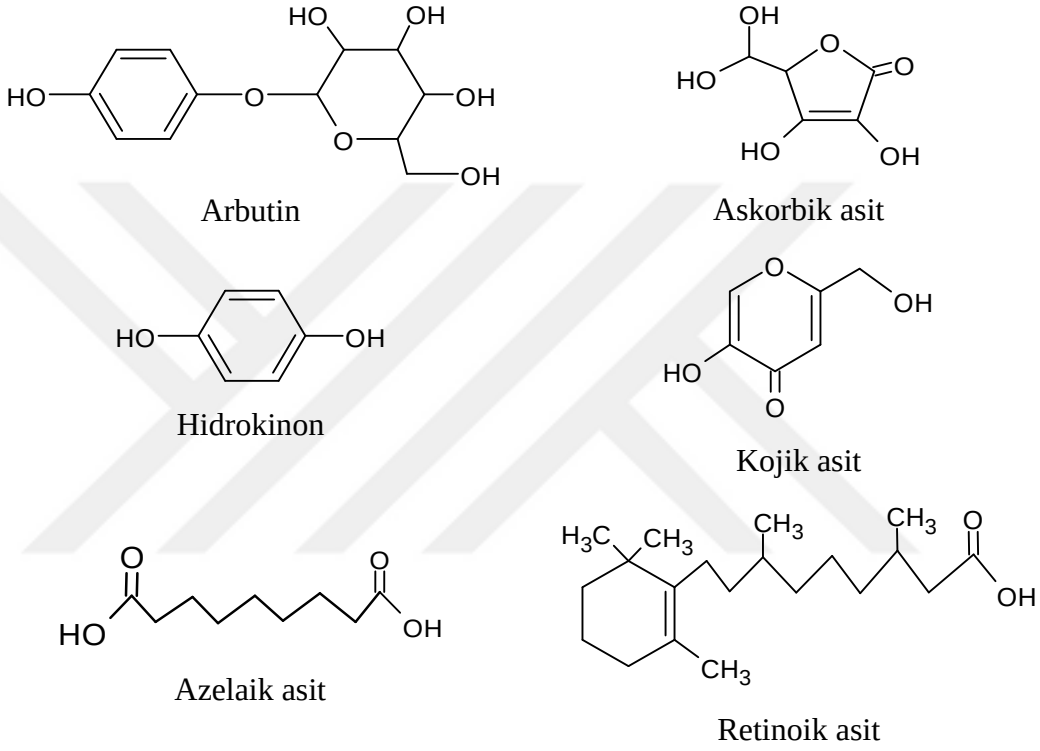


Şekil 2.11. Melanin sentez reaksiyonu (Bronze-Uhle ve ark. 2016)

Tirosinaz, tirosinaz protein-1 (TRP-1) ve dopakrom tautomeraz olarak da bilinen tirosinaz ilgili protein-2 (TRP-2), melanogenezi düzenleyen üç enzimdir (Şekil 2.11). Melanogenezin ilk basamağı, L-tirozin ve/veya L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonu ile başlamaktadır. İlk basamak aynı zamanda, reaksiyonun geri kalanı fizyolojik bir pH'ta kendiliğinden devam edebileceğinden, melanogenezin tek hız sınırlayıcı basamağıdır. Bu basamakta melanogenezin anahtar enzimi olan tirosinaz enzimi görev almaktadır. Dopakinon siklize olarak dopakromu oluşturmakta, oluşan dopakrom kendiliğinden dekarboksile olarak 5,6-dihidroksiindol (DHI), daha sonra TRP-2 varlığında DHI-2-karboksilik asit (DHICA) meydana getirmektedir. Son olarak oluşan DHI ve DHICA okside ve polimerize olarak eumelanini oluşturmaktadır. Bu süreçte DHICA'nın oksidasyonunu TRP-1 katalize etmektedir. Sistein veya glutatyon varlığında ise dopakinon, sisteinildopa veya glutatiyonildopaya dönüştürülmekte ve sonuçta kırmızı-sarı çözünür feomelanin pigmentleri elde edilmektedir. Melanogenez yolağında tirosinaz, TRP-1 ve TRP-2 olmak üzere üç enzim görev almakla birlikte kilit enzim tirosinazdır ve melanin sentezi için şarttır (Adak 2019).

Beyazlatıcı kozmetik ürünler, güneş kremi ürünleri, bronzlaştırıcı ürünler dışında diğer bir tanesi melanin biyosentezinde farklı mekanizmalarla engelleyici etkisiyle cilt renginin açılmasını sağlayan beyazlatıcı kimyasallardan oluşturulmuş ticari amaçlı kullanılan preparatlardır (Cabanes ve ark. 1994). Beyazlatıcı kremlerin etkinliğin arttırılmasında özellikle formülasyon içerisine ilave, ß-hidroksiasitler (glikolik, laktik veya malik asitler) veya α-hidroksiasitler (salisilik asit) gibi peelingte kullanılan kimyasalları içerebilirler. Bu kimyasallar ciltteki ölü deri ve hücrelerini uzaklaştırarak ağartıcı etkinliğin uygulanabilirliğini kolaylaştırmaktadır (Ghadishah ve Gorchynski 2002). Güneş kremlerine ilave edilen bu kimyasallar güneş ışınların karartıcı etkisinden korunmak için ilave edilirler (Piamphongsant 1998). Cilt beyazlatıcı kremlerinde kullanılan etken maddelerin farklı olarak antioksidan, yumuşatma, kenetleme veya tamponlama gibi başka özelliklerde içerebilmektedirler. Beyazlatıcı kremlerde kullanılan en popüler bileşikler arbutin, askorbit asit, azelaik asit, hidrokinon (ve onun monometil, monoetil ve monobenzil eterleri) kojik asit, retinoik asit ve fitik asit şeklinde sayılabilir (Şekil 2.12).

Kojik asitin beyazlatıcı etkisi dışında oksidatif özelliğinden dolayı dipalmitik esteri, yani kojik dipalmitat aracılığıyla kozmetik formülasyonlara ilave edilmektedir. Kullanılan etken maddelerin türevleri ana bileşiğin çözünürlüğünü değiştirdiğinden ve yeni preparatlar formüle etmekte kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Cilt ağartıcı olarak kullanılan civa preparatları zararlı etkilerinin ortaya çıkmasından sonra yarar-zarar dengesi tartışılır olmasından kullanımları yasaklanmıştır.



Şekil 2.12. Kozmetikte kullanılan beyazlatıcı etken maddelerin bazıları

Cilt beyazlatma ürünleri için son olarak yayınlanmış geçici inceleme yazısına göre (FR, 1982), sadece FDA (gıda ve ilaç dairesi) tarafından izin verilmiş cildi beyazlatıcı OTC ürünlerinde (%1,5-2 oran aralığında) bir kimyasal olan hidrokinona özel olarak dikkat edilmelidir. Bu bileşiğin zararlı yan etkilerinden kaynaklı AB kozmetik yönergesi 24.adaptasyonunun (Komisyon Yönergesi 2000/6EC) yürürlüğe girişinden itibaren AB çerçevesinde beyazlatıcı aktif bileşiği olarak izin verilmez. Hidrokinon sadece özel şart ve koşullar altında olmak üzere yapay tırnak sistemlerinde ve saç boya maddesi olarak kullanımına izin verilmektedir. Fakat türevleri olan hidrokinon monoetil ve hidrokinon monobenzil kozmetik kullanımı yasaktır. Araştırmalara göre kanserojen özellik ve dermatolojik yan etkilere sebep olarak hidrokinonun kozmetik içerisinde kullanımı gösterilmiştir (Joseph ve ark. 1998). Cildin iltihaplanması bölgesel uygulanan retinoik asite bağlanmıştır (Nordqvist ve Merh 1977). Kojik asit (Nakagawa ve ark. 1995) ve azelaik asit kozmetik kullanımlarına bakıldığında alerjik özellikte olduğu saptanmıştır. Beyazlatıcı etken madde tayinlerinde analitik yöntemler kullanılmaktadır. Avrupa birliği kozmetiklerde kullanılan beyazlatıcı ajanların kontrolü sağlama açısından tek bir analitik yöntem kullanılmaktadır (Komisyon yönergesi 95/32/EC). Belirtilen bu yöntem Avrupa Komisyonu tarafından kitap halinde düzenletmiştir. Metod hidrokinon ve onun zararlı türevlerin tayinine odaklanmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile kalitatif analizi yapılarak maddelerin belirlenmesi ve sıcaklık altında homojen su/metanol karışımı ile ekstrakte edilmiş numunenin UV/VIS cihazı ile dedeksiyonlu LC kullanarak madde miktarların tayinine dayanır. Şunu söylemek gerekir ki beyazlatıcı ajan tayinlerinde kullanılacak standart bir yöntem yoktur. Fakat genel olarak bakıldığında beyazlatıcı ajanların tayinleri Çizelge 2.15'de verilmiştir.

Çizelge 2.15. Beyazlatıcı ajanların tayinleri

Kozmetik Türü	Örnek Hazırlama	Hedeflenen Ajanlar	Analitik Teknik	Kaynak
Kremler	Numune THF: 0,025 M fosfat tamponu (pH 3,5) karışımıyla homojen süspansiyon elde edilinceye kadar karıştırılır	AP, MAP (Aynı şekilde farklı koruyucular da tayin edildi)	DPV, karbon pasta elektrot kullanarak SPE+LC-UV/VIS, mobil faz olarak MeCN: fosfat tamponu ile C18 kolonu	Sottofattori ve ark. 1998
Kremler ve Losyonlar	Kremler suda çözülür ve süzülür, sonra bir parçası pH'ı 10 olan tamponla karıştırılır. Losyonlar tamponla direk karıştırılır	KA	LC-UV/VIS, mobil faz olarak gradientli MeOH: pH 3,5 olan 0,025 M fosfat tamponu ile CN kolonu	Shih ve Zen 1999
Kremler	Krem örneği suda çözülür ve pH'ı 10 olan amonyum tamponuyla seyreltilir	ARB	DPV, ekran baskılı karbon elektrot kullanılarak	Shih ve Zen 2000
Kremler	Numune MeOH: su karışımı ile karıştırılır ve ısıtarak vortekslenir. Son olarak süzülür	HQ, HQDM, HQMB, HQMP, HQMPh	DPV, ekran baskılı karbon elektrot kullanılarak	Desiderio ve ark. 2000
Kremler ve Losyonlar	Numune suyla ekstrakte edilir ve süzülür	KA, MAP	LC-UV//VIS Mobil faz olarak MeCN: 0,05 M fosfat tampon (pH 2,5) ile diol kolonu (Tanımlama amaçlı oalrak TLC kullanılır)	Shih 2001
Kremler	Numune suyla karıştırılır ve 25 ^{o}C'da sonikasyon yapılır. Sonra süzülür ve N_2 ile oksijen uzaklaştırılır.	AA, ARB, MAP	GC-MS	Chang ve Chang 2003
	Numune 0,05 M fosfat tamponu (pH 2,5) ile ekstrakte edilir	AG, ARB, HQ, KA, MAP	FI-AMP, grafit elektrodu	Huang ve ark. 2004
Kremler ve losyonlar	Örnek suyla seyreltilir. Sonra karıştırılır. Diyaliz şişesine gönderilir ve online olarak enjekte edilir	ARB	LC-UV/VIS, Mobil faz olarak 1 mM TBAB içeren MeOH: 0,01 M fosfat tampon ile C18 kolonu	Lin ve ark. 2005

AA: Askorbik asit, AG: askorbil glukozit, AP: askorbil palmitat, ARB: arbutin, HQ: hidrokinon, HQDM: hidrokinondimetil eter, HQMB: hidrokinon monobenzil eter, HQMP: hidrokinonmonopropil eter, HQMPh: hidrokinon monofenil eter, KA: kojik asit, MAP: magnezyum askorbil fosfat, THF: tetrahidrofuran, MeOH: metanol, TBAB: tetrabutil amonyum bromür, MeCN: asetonitri

2.10. Yüzey Analiz teknikleri

Optimizasyon, bir uygulama ya da deney prosesini en az maliyetle en iyi duruma getirmek için tercih edilen yöntemler ve uygulamalardır. Belirli kurallara göre uygulanıp istatistiksel hesaplamalar yapılır. Optimizasyon yöntemleri genel olarak yüzey analiz teknikleri (Response surface methodology) başlığı altında incelenir (Şahin ve ark. 2019). Literatürde pek çok deneysel parametrelerin verim değerleri üzerindeki etkisini incelemek için yüzey analiz teknikleri kullanılır. Merkezi kompozit dizayn (CCD) yöntemi de RSM içinde en çok tercih edilen yöntemdir. Aşağıdaki denklem (2.1), bir CCD'deki toplam deney sayısını (N) hesaplamak için kullanılabilir:

$$N = 2^k + 2k + x_0 \quad (2.1.)$$

burada k değişken sayısıdır. CCD ile tahmin edilen yanıtları hesaplamak için tüm etkileşim terimlerini içeren ikinci dereceden polinom denklemi (2.2) kullanılır.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{4} b_i x_i + \sum_{i=1}^{4} b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{3} \sum_{j=i+1}^{4} b_{ij} x_i x_j \quad (2.2.)$$

burada y yanıt değişkenidir, b_0 bir sabittir ve b_i, b_{ii} ve b_{ij} sırasıyla doğrusal, ikinci dereceden ve değişkenler arası etkileşim katsayılarıdır. x_i ve x_j bağımsız değişkenlerdir ($i \neq j$). Değişkenler belirlendikten sonra oluşturulan deneysel dizayn tablosuna göre deneyler yapılır. Deneylerin sonuçları Design Expert programı (7.0.0 versiyonu) kullanılarak istatistiksel olarak ANOVA analizi ile hesaplanır.

2.11. *Chlorella vulgaris*

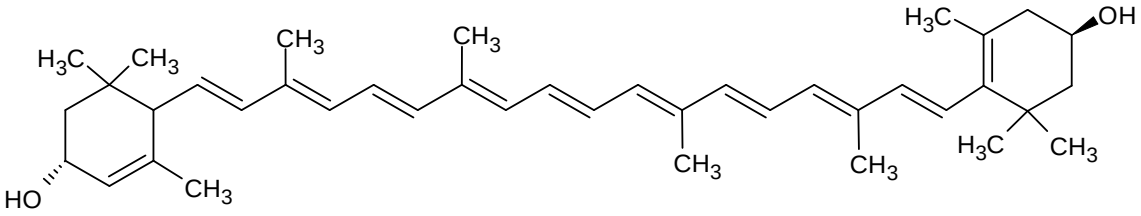
Mikroalgler içerdiği yağ asitleri, karbohidrat, pigment, vitaminler, mineral, antioksidanlar, steroller ve biyoaktif polifenoller içeren zengin bir kaynak sunan mikroskop yardımıyla görülebilen sularda yaşayan canlılardır (Yılmaz 2019). Algler metabolizma olarak otorofik veya heterotrofik bir yapıya sahip olabilir. Ototrofik gruplar büyümek için inorganik bileşenlere tuz, karbondioksit ve ışık enersine ihtiyaç duyar. Heterotrofik gruplar, fotosentetik olmamalarından dolayı mikroalgler harici bir organik bileşen kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Kozmetikte kullanılan mikroalgler ekstrakt formunda formülasyonlara ilave edilir. Etken madde olarak kullanılan mikroalglerin seçimi önemlidir. Mikroalgler ciltteki kollajen üretimini arttırmasıyla cildin yenilenmesini destekler ve kırışıkların zamanla azalmasına yardımcı olan cilt bakım ürünlerinde kullanılabilir. Ayrıca erken yaşlanma karşıtı, yüz, cilt, saç bakım,

güneş koruycu, cilt sıkılaştırma ve çatlak kremlerinde kullanılabilmektedir (Metin ve Baygar 2018). *Chlorella vulgaris*'in göz çevresi kreminde, *Spirulina platensis*'in krem formülasyonlarında kullanılmaktadır (Koluman ve Selçuk 2016). Tek hücreli mikroalg olan *Chlorella vulgaris*'in içeriği Çizelge 2.15'de verilmiştir.

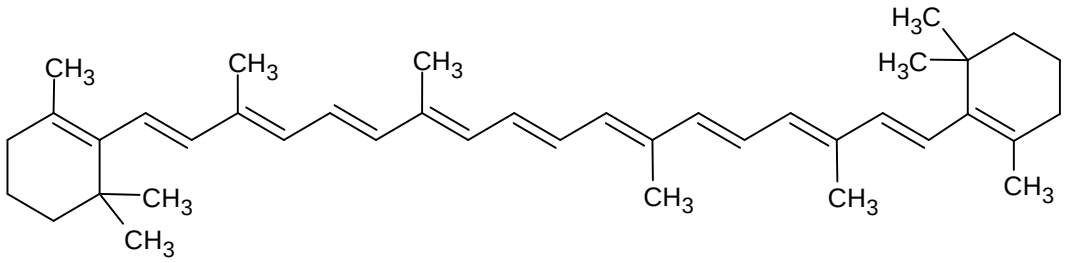
Çizelge 2.16. *Chlorella vulgaris* içeriğinde bulunan bileşenler (Nasir ve ark. 2017)

Chlorella vulgaris	**% içerik**
Protein	51 - 58
Karbohidrat	12 - 17
Yağ	14 - 22

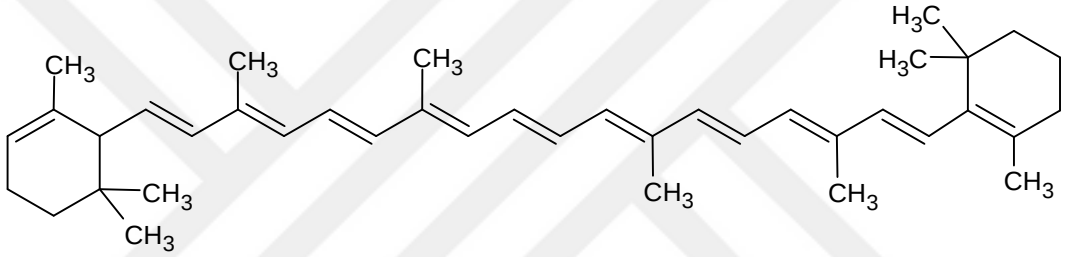
Chlorella vulgaris'in yapısı çekirdek gibi ve küreye benzer. Kendini dış ortamlardan hücre duvarı sayesinde koruyabilmektedir. *Chlorella vulgaris* eşeysiz ve hızlı üreyebilen autospordur. Stresli koşullar altında büyüyebilir. *Chlorella* türlerinin kullanım amaçlarından bazıları; aktif immünostimülatör, serbest radikal süpürücü, kan lipidlerini azaltımı, mide ülserlerinin, yaraların ve kabızlığın önlenmesi ve gıda katkı maddesi olarak kullanılır (Hamed 2016). *Chlorella vulgaris* fazla miktarlarda klorofil ve karotenoid bileşikleri bulunur. Karotenoidler insan veya hayvanlarda sentezlenmeyen sadece mikroorganizma ve meyvelerde sentezlenen doğal pigmentlerdir. Lipofilik ve isoprenoit moleküller, deniz canlıları, bitkiler, meyve ve sebze renklerinin belirlenmesinde sorumlu bileşiklerdir (Ben-Amotz ve Fishler 1998, Gouveia ve Empis 2003). Kloroplast, bitkilerdeki kromoplastlar ve diğer fotosentetik organizmalarda da bulunabilmektedir. Dünya üzerinde bilinen 700'ün üzerinde karotenoid vardır. Çift bağlarının sayısına göre cis-trans izomerlerini içerir. Karotenoid yapısındaki konjuge çift bağlar Uv ışınları, oksijen, sıcaklıkla parçalanabilir ve oksidasyona uğrarlar (Nasir ve ark. 2017). Karotenoidler, karotenler ve ksantofiller olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Karotenoidlerin kimyasal yapıları şekil 2.12'de verilmiştir.



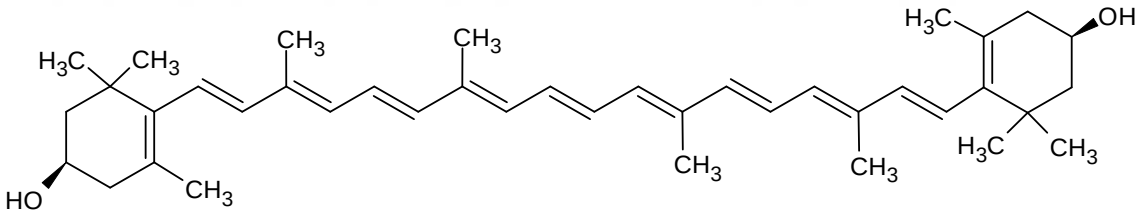
Lutein



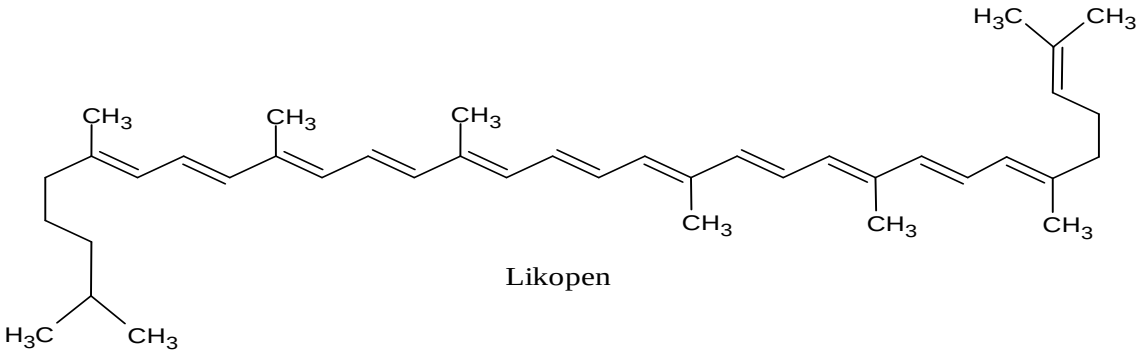
β-karoten



α-karoten

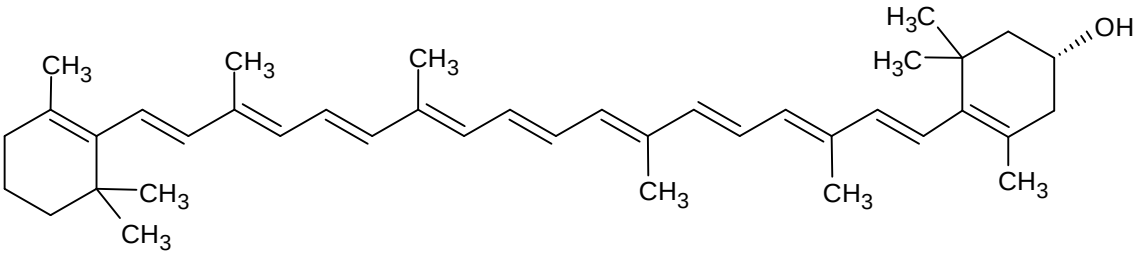


Zeaksantin

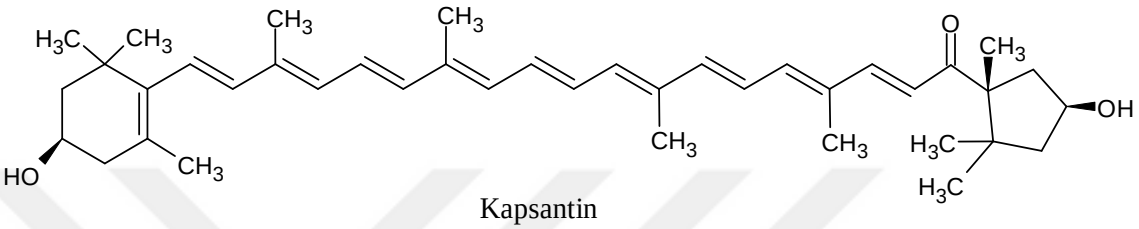


Likopen

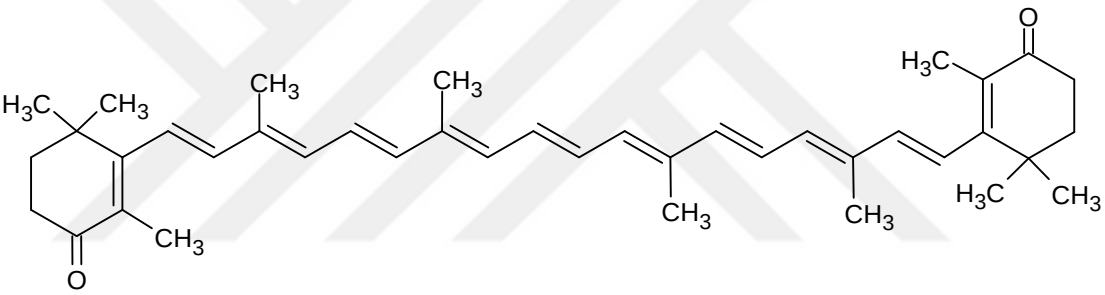
Şekil 2.13. Karotenoidlerin kimyasal yapıları



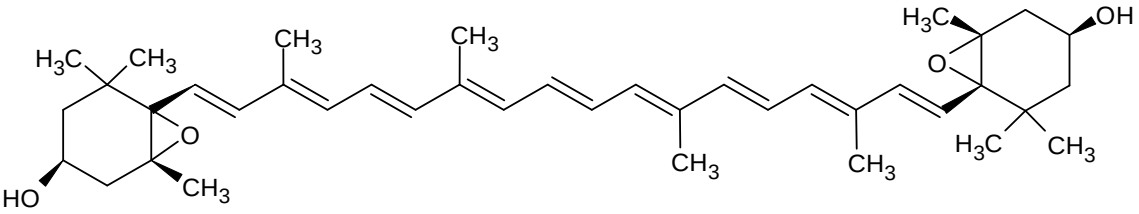
β-kriptoksantin



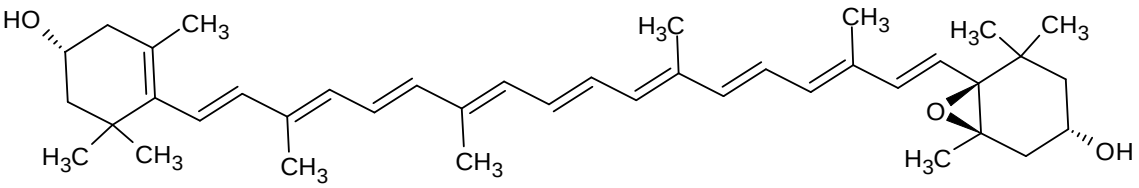
Kapsantin



Kantaksantin

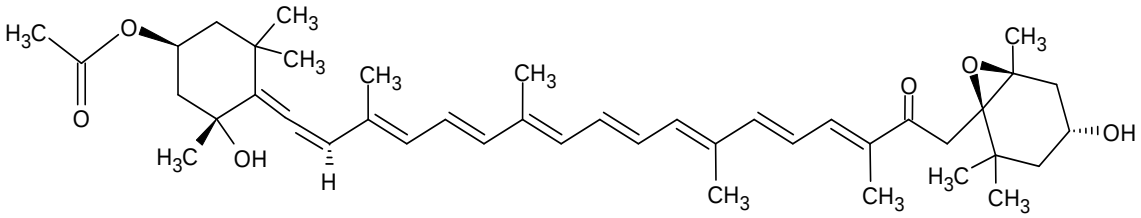


Violaksantin



Antreaksantin

Şekil 2.13. Karotenoidlerin kimyasal yapıları (devam)



Fukosantin

Şekil 2.13. Karotenoidlerin kimyasal yapıları (devam)

Karotenoidler, insan sağlığına etkileri pek çok faktöre (dağılımi absorpsiyon, ulaşım ve depolama vb.) bağlıdır (Yeum ve Russell 2002). Renkli meyve ve sebzeler başlıca karotenoid bileşikler içerirler. β-karoten ve α-karoten sarı-turuncu sebze ve meyvelerde, α-kriptoksanthin turuncu meyvelerde, lutein koyu yeşil sebzelerde ve likopen domates ve domates ürünlerinde karotenoid açısından zengindir (Rao ve Rao 2007). Karotenoidlerin son yıllar üzerinde yapılan çalışmalar insan sağlığını tehdit eden hastalıkları önlemek amacıyla yapılmaktadır. Yapılan literatür çalışmasında *Chlorella vulgaris* yapısında β-karoten, α-karoten ve lutein karotenoidleri belirlenmiştir (Nasir ve ark. 2017).

Ayrıca yapılan çalışmalarda *Chlorella vulgaris* ekstraktının kollajen sentezine katkı sağladığı için, cilt dokusuna destek ve kırışıkların azalmasına yardımcı olması ile kozmetikte cilt bakım ürünlerinde kullanılabileceği anlaşılmıştır (Metin ve Baygar 2018, Wang ve ark. 2015). Başka bir çalışmada hidrojel bazlı *Chlorella vulgaris*, cilt yaraların hızlı iyileştirilmesi, iltihap önleyici, akut ve kronik yaraların iyileşmesinde potansiyel kozmetik ürün olabileceği belirtilmiştir (de Melo ve ark. 2019)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez Kapsamında Çalışılan Bitki Materyali

Tez kapsamında kullanılan ve 2020 yılında Doğu Hindistan'dan hasat edilen havlıcan bitkisi, 2021 yılında Türkiye/Bursa/Nilüfer ilçesinde bulunan bir aktardan toz formunda temin edildi.

3.1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Aşağıda bulunan Çizelge 3.1'de cihazların kullanım özellikleri ve kullanım amaçları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihaz özellikleri ve kullanım amaçları

Kullanılan Cihazlar	Model	Kullanım Amacı
HPLC	1200 Series, Agilent Technologies	Havlıcanda bulunan fenolik maddelerin kantitatif tayininde kullanılmıştır.
UV-VIS spektrofotometresi	Cary 50 Conc, Varian	Spektroskopik analizlerde kullanılmıştır.
Vorteks	VM-10, Wisd	Analizlerde kullanılacak kimyasalların karıştırılmasında kullanılmıştır.
Döner buharlaştırıcı	Re100	Analizlerde organik fazların uçurulmasında kullanılmıştır.
Ultrasonik karıştırıcı	2,8 L, United	Analizlerde kullanılacak kimyasalların, çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
8'li manyetik karıştırıcı	MS-MP8, Wisd	
Hassas analitik terazi	MS105DU, Mettler (± 0,00001 g)	Analizlerde kullanılacak kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
pH metre	HI 221, Hanna	Antioksidan kapasite tayininde pH kontrolünde kullanılmıştır.
Santrifüj	Z206 A, Hermle	Havlıcan ekstraksiyon işlemlerinde kullanılmıştır.
Distile su cihazı	Option Q DV25, ElgaPurelab	Analizler için gerekli saf suyu temin etmek için kullanılmıştır.
FT-IR	Thermoscientific, Nicolet 6700	Hidrojellerin yapısal analizleri için kullanılmıştır.
SEM	Carl Zeiss Evo 40, Germany	Hidrojellerin yapısal analizleri için kullanılmıştır.

3.1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar

Analizlerde kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Firma	Ürün Kodu
β-Siklodekstrin	Sigma-Aldrich	779105
1,5-difenilkarbazit	Sigma-Aldrich	259225
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Alginik asit	Sigma-Aldrich	71238
Aseton	Merck	100013
Asetonitril	Sigma-Aldrich	34851
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich	209198
Di-Potasyum hidrojen fosfat	Merck	A964801
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteau reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Formik asit	Merck	100264
Fosforik asit	Merck	100563
Galangin	Extrasynthese	1114S
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Gliserin	Kale kimya	-
Hidroklorik asit	Merck	100314
Oktildodekanol	Kalekimya	-
Kalsiyum klorür dihidrat	Merck	102382
Kamferol	Sigma-Aldrich	K0133
Kojik asit	Sigma-Aldrich	K3125
Metanol	Merck	106007
L-DOPA	Sigma-Aldrich	D9628
p-kumarik asit	Sigma-Aldrich	C9008
Potasyum dihidrojen fosfat	Fisher scientific	P/4760/60
Potasyum dikromat	Sigma-Aldrich	207802
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich	746436
Potasyum peroksidisülfat	Merck	105091
Sephadex LH-20	Sigma-Aldrich	LH20100

Çizelge 3.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar (devam)

Tirosinaz	Sigma-Aldrich	T3824
Kıvamlaştırıcı (Hidroksietil akrilat, Sodyum akriloil dimetil, Taurat kopolimer, Isohekzadekan, Polisorbat 60)	Kalekimya	-
Sitrik asit monohidrat	Kimetsan	KIM-SAM/01CP
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck	141677
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	795429
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	791768
Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat	Sigma-Aldrich	217255
Kondisyoner (Dimetikon)	Kale kimya	-
Koruyucu (Etilheksilgliserin, Fenoksietanol)	Kale kimya	-
Tri-sodyum sitratdihidrat	Merck	106448
Kuersetin	Sigma-Aldrich	Q4951
pH 7,00 fosfat tamponu	VWR Chemical	32096291

3.1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Sarf Malzemeler

Analizde kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Analizlerde kullanılan sarf malzemeler

Malzemeler	**Model**	**Katalog Kodu**
Mikropipet (10 – 100 µL)	Eppendorf Research	Z683809
Mikropipet (100 – 1000 µL)	Eppendorf Research	Z683825
Mikropipet (500 – 5000 µL)	Eppendorf Research	Z683833

3.1.5. Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltiler

Toplam fenolik madde tayininde kullanılan çözeltiler

▪Lowry A çözeltisi: 0,4 g NaOH katısı (0,1 M) %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanır (100 mL).

▪ Lowry B çözeltisi: 0,5 g $CuSO_4$, %1'lik $NaKCuH_4O_6$ çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanır (100 mL).

▪ Lowry C çözeltisi: 50:1 (v:v) oranında Lowry A ve Lowry B çözeltileri karıştırılır.

▪ Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu çözeltisi 1:3(v:v) oranında saf su ile seyreltilir.

▪ Gallik asit çözeltisi: 0,1 g gallik asit az miktar metanolde çözülür ve balon jojede hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Antioksidan kapasite tayininde kullanılan çözeltiler

ABTS metodu

▪ABTS çözeltisi: 2,45 mM $K_2S_2O_8$ katısı 7 mM ABTS çözeltisi içerisinde çözülür (25 mL). 16 saat karanlık ortamda bekletilir. Analizler öncesi 1:10 (v:v) oranında saf su ile seyreltilir.

▪Troloks çözeltisi: 0,1 g Troloks katısı az miktar metanolde çözülür ve balon jojede hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

CHROMAC metodu

▪ 0,2 M KCl çözeltisinin hazırlanışı: Toplam hacim 100 mL(balon jojede) olacak şekilde bir miktar saf suda 1,49 g KCl çözülür ve hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

▪ 0,2 M HCl çözeltisinin hazırlanışı: Derişik HCl asitten (12,06 M) 1,66 mL alınarak toplam hacim 100 mL (balon jojede) olacak şekilde saf su ile seyreltilir.

▪ pH 1,2 tamponun hazırlanışı: Toplam hacim 100 mL (balon jojede) olacak şekilde 0,2 M KCl (25 mL) ve 0,2 M HCl (42,5 mL) karıştırılır saf su ile tamamlanır.

▪ pH 2,8 tamponun hazırlanışı: Toplam hacim 1 L (balon jojede) olacak şekilde 6,24 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0,68 mL %85'lik (w/w) H_3PO_4 bir miktar saf suda çözülür 1 L'ye tamamlanır.

▪ $K_2Cr_2O_7$ çözeltisinin hazırlanışı: 0,5 mg $K_2Cr_2O_7$ katısı bir miktar saf suda çözülür 100 mL'ye (balon jojede) saf su ile tamamlanır.

▪ 100 mg/L 1,5-difenilkarbazit çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g 1,5-difenilkarbazit katısı 70 mL aseton, 30 mLpH 2,8 tampon çözeltisinde çözülür. 100 mg/L 1,5-difenilkarbazit 8,25 mg/L'ye pH 2,8 tampon çözeltisiyle seyreltilir.

▪ Troloks çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g troloks katısı bir miktar metanolde çözülür son hacim olan 100 mL'ye (balon jojede) tamamlanır.

Anti-tirosinaz inhibisyonu tayininde kullanılan çözeltiler

▪1 M 100 mL KH_2PO_4 çözeltisi; 17,4183g katı tartılarak bir miktar saf suda çözünmesi sağlanır. Çözünme tamamlanınca 100 mL'lik balon joje içerisinde saf su ile hacim tamamlaması gerçekleştirilir.

▪ 1 M 100 mL K_2HPO_4 çözeltisi; 13,6092 g katı tartılarak bir miktar saf suda çözünmesi sağlanır. Çözünme tamamlanınca 100 mL'lik balon joje içerisinde saf su ile hacim tamamlaması gerçekleştirilir.

▪ 50 mmol/L pH 6,80 tamponunun hazırlanışı; Hazırlanan 1 M KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 çözeltilerinden sırasıyla 26,5 mL ve 23,5 mL 1000 mL'lik balon jojeye alınır hacim saf su ile tamamlanır.

▪ 0,9 mg/mL L-DOPA çözeltisinin hazırlanışı; L-DOPA katısından 45 mg tartılıp beher içerisinde 6,80 tampon çözelti ile çözülür ve 50 mL'lik balon joje'de hacim fosfat tamponuyla tamamlanır.

▪ 1000 μM kojik asit çözeltisinin hazırlanışı; 14,22 mg kojik asit katısından tartılır bir miktar pH 6,80 fosfat tamponu ile çözülüp 100 mL'lik balon joje'de son hacim tamamlanır. 100 μL alınarak 9,9 mL pH 6,8 fosfat tamponu ile hacim tamamlaması yapılarak 100 μM Kojik Asit çözeltisi hazırlandı.

▪ 500 U/mg 20 mL Tirosinaz çözeltisinin hazırlanışı; 10 mg Tyrosinase from mushroom tartılarak bir miktar pH 6,8 fosfat tamponunda çözülür, 20 mL'lik balon jojede son hacim fosfat tamponu ile tamamlanır

Kromatografik analizlerde kullanılan çözeltiler

▪ %1'lik formik asit çözeltisinin hazırlanışı: 10 mL derişik formik asit çözeltisi bir miktar saf su içerisinde çözülür son hacim saf su ile 1 L'ye balon jojede tamamlanır.

▪ Havlıcan örneklerindeki fenolik bileşiklerin kantitatif tayini için standart fenolik bileşikler metanol ile çözülerek 1 ile 20 mg/L derişimleri arasında çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler yardımıyla kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır.

Kemometrik çalışmalarda kullanılan çözeltiler

▪ pH 5,5 sitrat tamponun hazırlanışı: 2,8257g sitrik asit monohidrat($C_6H_8O_7.H_2O$) katısı bir miktar saf suda çözülür üzerine 0,7128g sodyum sitratdihidrat($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) katısı ilave edilir. Hacim 250 mL'ye balon jojede saf su ile tamamlanır.

▪%2 (w/v) $CaCl_2$ çözeltisinin hazırlanışı: 1 g $CaCl_2.2H_2O$ katısı bir miktar su içerisinde çözülür balon jojeye aktarılır, son hacim 50 mL'ye saf su ile tamamlanır.

▪ %1,5 (w/v) sodyum aljinat çözeltisinin hazırlanışı: Aljinik asit sodyum tuzundan 0,3g tartılır bir miktar suda çözülür balon jojeye aktarılır, son hacim 20 mL'ye saf su ile tamamlanır.

▪ β-siklodekstrin-havlıcan çözeltisi: 2,0630 g β-siklodekstrin tartıldı. Üzerine 48 mL havlıcan etanol ekstraktı (40 g havlıcan, 200 mL %80 EtOH (%v/v)) ve 55 mL havlıcan metanol ekstraktı (40 g havlıcan, 200 mL %80 MeOH (%v/v)) eklendi. Ektraksiyon hazırlanışı Şekil 3.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

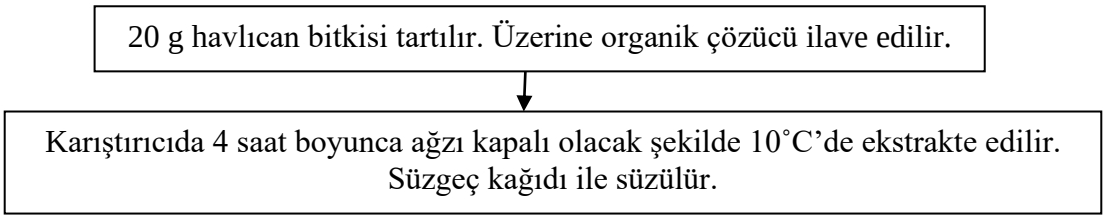
3.2. Yöntem

Tez kapsamında yapılan çalışmaları altı ana başlık altında inceleyeceğiz. Bunlar;

▪ Örnek hazırlama işlemleri
▪ Spektroskopik yöntemler
▪ Kromatografik yöntemler
▪ Saflaştırma çalışmaları
▪ Kemometrik çalışmalar
▪ Anti-tirosinaz enzim aktiviteleri

3.2.1. Örnek Hazırlama İşlemleri

Toz formunda temin edilen havlıcan bitkisi laboratuvarda oda sıcaklığında kapalı opak bir kapta muhafaza edilmiştir. Havlıcan bitkisinin ekstraksiyon yöntemi Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Havlıcan bitkisinin ekstraksiyon yöntemi

Ekstraksiyon işlemlerinde organik çözücü olarak 100 mL %50 ve %80 etil alkol ve metanol olacak şekilde ayrı ayrı 4 farklı ekstrakt hazırlanır.

3.2.2. Spektroskopik Yöntemler

Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde tayini

Elektron transferi metoduna dayanan Folin-Ciocalteu yöntemiyle ekstraktlarda bulunan toplam fenolik madde miktarı tayini yapılmıştır (Güneş ve ark. 2016). Tüplere 100 µL havlıcan ekstraktı alınır, üzerine 1900 µL saf su, 2500 µL Lowry C çözeltisi ve 250 µL seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden ilave edilir. Karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta bekletilen örneklerin 750 nm'de UV-VIS spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri yapılır. Kalibrasyon grafiği için gallik asit çözeltisi standart olarak kullanılmıştır. Belirli aralıklarla artan gallik asit çözeltileri hazırlanıp en küçük kareler yöntemi ile kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Çizelge 3.4). Toplam fenolik madde miktarları mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. Folin-Ciocalteu kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru Denklemi	Regresyon katsayısı (R^2)
Folin-Ciocalteu	1-50	y = 0,0180x - 0,0390	0,9950

ABTS yöntemiyle antioksidan kapasite tayini

Havlıcandan elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite tayini ABTS yöntemi ile yapılmıştır (Şahin ve ark. 2012, Re ve ark. 1999). 100 µL havlıcan ekstraktı tüpe alınır, 3900 µL etanol ilave edilir, karıştırılır. Üzerine 1 mL seyreltilmiş ABTS çözeltisi ilave edilir, karıştırılıp 6 dakika sonunda 734 nm'de UV-VIS spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri yapılır ($A_{örnek}$). Kör çözelti olarak 4 mL etanol ve 1 mL ABTS ilave edilerek 6 dakika sonra absorbans ölçümü yapılarak $A_{kör}$ değeri kaydedilir. Absorbans değerleri kulanılarak %inhibisyon değerleri belirlenmiştir (Eşitlik 3.1.)

$$\%\, inhibisyon = \frac{A_{kör} - A_{örnek}}{A_{kör}}\, x\, 100 \qquad (3.1.)$$

Kalibrasyon grafiği için standart olarak troloks çözeltisi kullanılmıştır. Belirli miktarlarla artan troloks çözeltileri hazırlanıp en küçük kareler yöntemiyle kalibrasyon grafiği belirlenmiştir (Çizelge 3.5). Kalibrasyon grafiği kullanılarak havlıcan ekstraktlarının antioksidan kapasite değerleri mg troloks eşdeğeri (TE)/g örnek olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. ABTS kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru Denklemi	Regresyon katsayısı (R^2)
ABTS	0,1-8	y = 10,2800x + 8,6750	0,9990

CHROMAC yöntemiyle antioksidan kapasite tayini

Havlıcan ekstraktlarının antioksidan kapasite miktarları CHROMAC yöntemi ile de yapılmıştır (Karkar ve ark. 2020, Nasir ve ark. 2017). 100 µL havlıcan ekstraktından alınır üzerine 400 µL saf su, 3500 µL pH 2,8 fosfat tamponu, 500 µL potasyum dikromat çözeltisi eklenir ve karıştırılır. En son 500 µL 1,5-difenil karbazit eklenip karıştırılır, karanlık ortamda 50 dakika beklenir. Daha sonra 540 nm'de UV-VIS spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri yapılır ($A_{örnek}$). Standart olarak troloks çözeltisi kullanılmıştır. Belirli aralıklarla artan troloks çözeltileri hazırlanıp en küçük kareler yöntemi ile kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. CHROMAC kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru Denklemi	Regresyon katsayısı (R^2)
CHROMAC	0,1-50	y = 0,0040x + 0,3460	0,9940

Kör için pH 1,2 tamponu kullanılmıştır. 500 µL saf su üzerine, 3500 µL pH 1,2 tamponu, 500 µL potasyum dikromat çözeltisi ve 500 µL 1,5 difenilkarbazit çözeltileri eklenir karıştırılır ve 50 dakika karanlıkta bekletilip 540 nm'de UV-VIS spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri yapılır ($A_{kör}$). Eşitlik 3.2'ye göre örneklerin absorbansı hesaplanır.

$$A = A_{kör} - A_{örnek} \quad (3.2.)$$

3.2.3. Kromatografik Yöntemler

HPLC-DAD cihazı ile fenolik maddelerin kantitatif tayini

Havlıcan içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Dedektör olarak foto diyot serili dedektör (DAD) seçilmiştir. %1 (v/v) formik asit ve asetonitril çözeltileri sistemin hareketli fazını oluşturmaktadır. C18 kolonu (XBridge C18 3,5 µm; 4,6x250 mm) 0,5 mL/dk akış hızı 10 µL enjeksiyon hacmi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin HPLC tayinlerinde galangin, kamferol ve kuersetin için 360 nm, p-kumarik asit içinde 320 nm'de çalışılmıştır. HPLC çalışma programı Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. HPLC çalışma programı

Zaman (dk)	**Kullanılan hareketli fazlar (%)**	
	%1'lik formik asit	Asetonitril
0	90	10
10	87	13
20	59	41
25	30	70
35	90	10
36	90	10

HPLC doğru denklemi, standart fenolik maddelerin artan konsantrasyonuna karşılık alınan pik alanları kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışılan örneklerin pik alanı kalibrasyon denkleminde yerine konularak sonuçlar mg/g olarak hesaplanmıştır.

3.2.4. HPLC-DAD cihazı ile karotenoidlerin kantitatif analizi

Chlorella vulgaris içerisinde bulunan karotenoid bileşiklerin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Dedektör olarak foto diyot serili dedektör (DAD) seçilmiştir. %95 metanol-%5 H_2O (H_2O: %0,05 trimetilamin içermektedir) ve tert-bütil metil eter çözücüleri ile gradient programlı hareketli faz sistemi kullanılmıştır. YMC Carotenoid C30 (250x4.6 mm, 5µm, YMC Co., Ltd) kolonu, 1,0 mL/dk akış hızı ve 20 µL enjeksiyon hacmi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Karotenoidlerin HPLC tayini için 450 nm'de çalışılmıştır. HPLC çalışma programı Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. HPLC çalışma programı

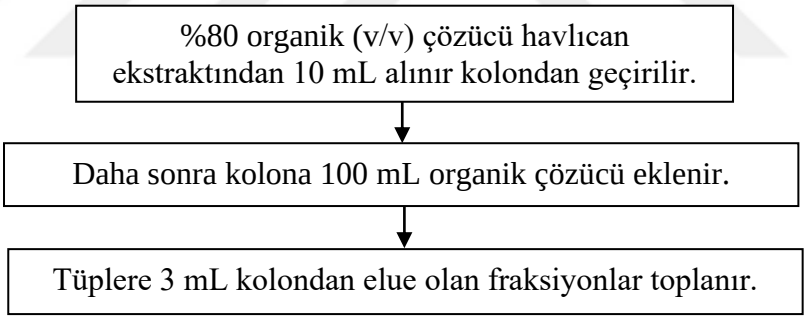
Zaman (dk)	Kullanılan hareketli fazlar (%)	
	%95 metanol	ter-bütil metil eter
0	95	5
15	80	20
20	70	30
30	60	40
40	25	75
45	95	5

HPLC doğru denklemi, standart karotenoidlerin artan konsantrasyonuna karşılık alınan pik alanları kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışılan örneklerin pik alanı kalibrasyon denkleminde yerine konularak sonuçlar mg/g olarak hesaplanmıştır.

.

3.2.5. Saflaştırma Çalışmaları

Hazırlanan %80 etanol ve %80 metanol havlıcan ekstraktlarında bulunan fenolik maddeler Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma yöntemi Şekil 3.2'de özetlenmiştir.

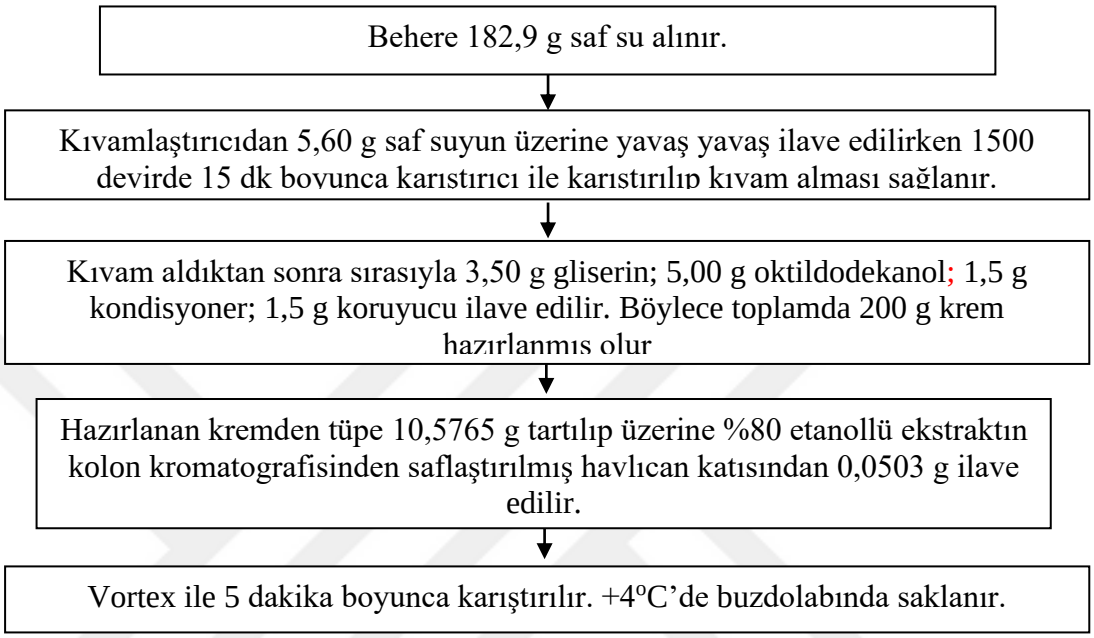


Şekil 3.2. Kolon metodu ile fenolik maddelerin saflaştırılması (etanol ve metanol)

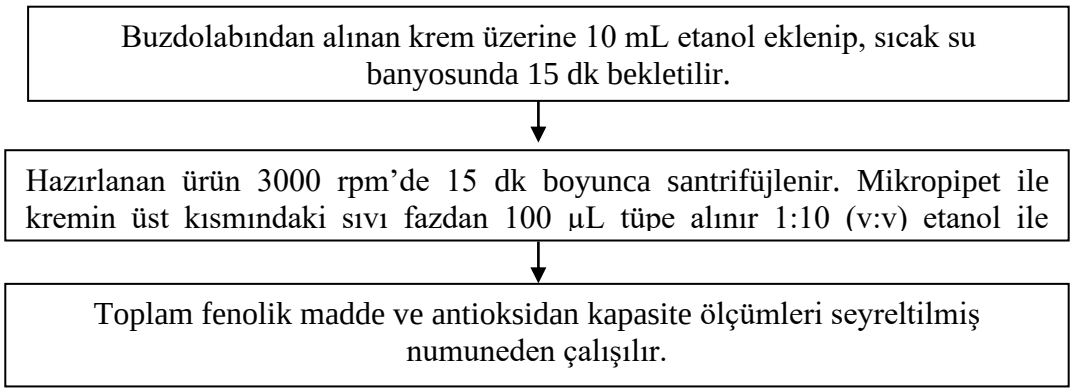
Elde edilen fraksiyonların (3 mL/tüp) 320 ve 360nm'de absorbans ölçümleri UV-VIS spektrofotometresi ile yapıldı. Sonra tüp numaralarına karşı absorbans değerleri her iki dalga boyu için ayrı ayrı grafiğe geçirildi. Daha sonra fraksiyonlar birleştirilerek saflaştırılan fenolik madde gruplarının ayrılması sağlanmıştır. Birleştirilen fraksiyonların toplam fenol ve antioksidan kapasite tayinleri yapılmıştır. Bu yöntemler bölüm 3.2.2'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Havlıcanlı-krem hazırlanışı

Kolondan toplanıp birleştirilen fraksiyonlarda bulunan metanol (50˚C) döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldıktan sonra elde kalan kalıntı alınıp tartıldı. Saflaştırılan fenolik madde kalıntısı krem hazırlanışında kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Havlıcanlı yüz kreminin hazırlanışı

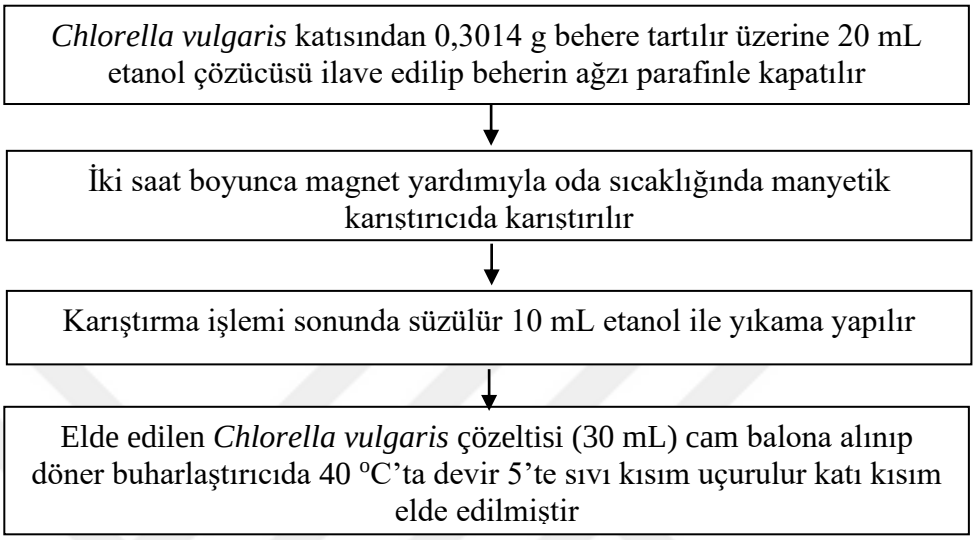


Şekil 3.4. Toplam fenol ve antioksidan kapasite ölçümleri için krem örneklerinin hazırlanışı

Ayrıca hazırlanan krem örneğinin toplam fenol ve antioksidan kapasite tayinleri yapılmıştır. Bu yöntemler Bölüm 3.2.2'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Toplam fenol ve antioksidan kapasite ölçümleri için hazırlanan örnekler Şekil 3.4'de anlatılmıştır.

Chlorella vulgaris ekstraksiyonu

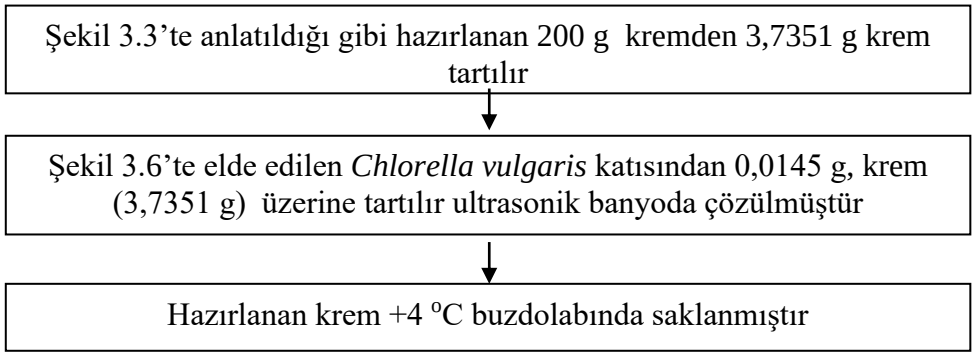
Tez kapsamında hazırlanacak kremlerde mikroalg ekstraktıda kullanılacaktır. Bu amaçla *Chlorella vulgaris*'in ekstraksiyon aşamaları Şekil 3.5'te anlatılmıştır.



Şekil 3.5. *Chlorella vulgaris* ekstraksiyon aşamaları

Chlorella vulgaris içeren kremin hazırlanışı

Chlorella vulgaris içeren kremin hazırlanışı Şekil 3.6'da anlatılmıştır

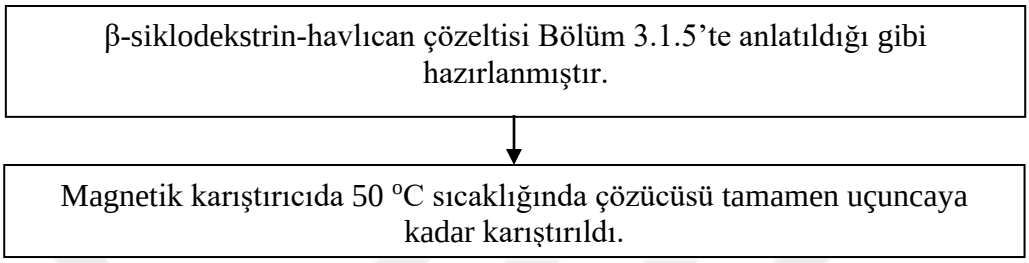


Şekil 3.6. *Chlorella vulgaris* ekstraktlı krem

Şekil 3.4'te belirtildiği gibi örneklerde toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite ölçümleri seyreltilmiş numuneden çalışılır.

3.2.6. Kemometrik Çalışmalar

Kemometrik yöntemlerde kullanılacak ektsrakt kalıntısı için havlıcan ekstraktı β-siklodekstrin ile enkapsule edildi. Havlıcan ekstraktının enkapsülasyon işlemi Şekil 3.7'de anlatılmıştır.



Şekil 3.7. Havlıcan ekstraktının enkapsülasyonu

Galangin-aljinat hidrojellerinin hazırlanması için kemometrik yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan seviye değerleri ve deney bilgileri Çizelge 3.9.-3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri

Faktör	**Kodlanmış seviyeler**				
	-2	**-1**	**0**	**1**	**2**
Na-Al (%w/v)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
$CaCl_2$ (%w/v)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Zaman (dk)	10	20	30	40	50
Ekstrakt (%w/v)	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9

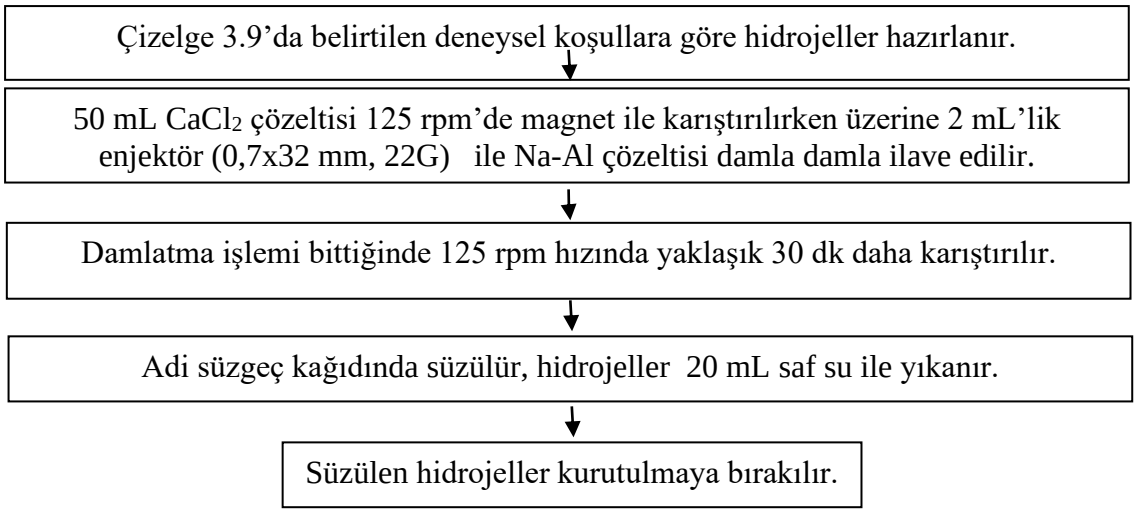
Çizelge 3.10. Gerçek seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn tablosu

Deney	x_1	x_2	x_3	x_4
	Na-Al (%w/v)	**$CaCl_2$ (%**w/v)	**Zaman (dk)**	**Ekstrakt (%**w/v)
1	1	1,5	20	0,3
2	2	1,5	20	0,3
3	1	2,5	20	0,3
4	2	2,5	20	0,3
5	1	1,5	40	0,3
6	2	1,5	40	0,3
7	1	2,5	40	0,3

Çizelge 3.10. Gerçek seviye değerleri için merkezi kompozit dizayn tablosu (devam)

8	2	2,5	40	0,3
9	1	1,5	20	0,7
10	2	1,5	20	0,7
11	1	2,5	20	0,7
12	2	2,5	20	0,7
13	1	1,5	40	0,7
14	2	1,5	40	0,7
15	1	2,5	40	0,7
16	2	2,5	40	0,7
17	0,5	2	30	0,5
18	2,5	2	30	0,5
19	1,5	1	30	0,5
20	1,5	3	30	0,5
21	1,5	2	10	0,5
22	1,5	2	50	0,5
23	1,5	2	30	0,1
24	1,5	2	30	0,9
25	1,5	2	30	0,5
26	1,5	2	30	0,5
27	1,5	2	30	0,5
28	1,5	2	30	0,5
29	1,5	2	30	0,5
30	1,5	2	30	0,5

Hidrojel Oluşumu

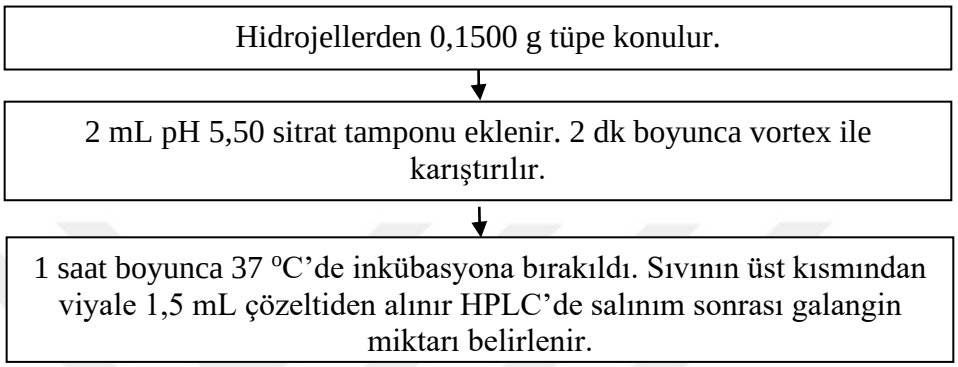


Şekil 3.8. Hidrojellerin elde edilişi

Kemometrik yöntemle oluşturulun hidrojellerin yapılışı Şekil 3.8'de anlatılmıştır.

Hidrojellerden galangin salınım çalışması

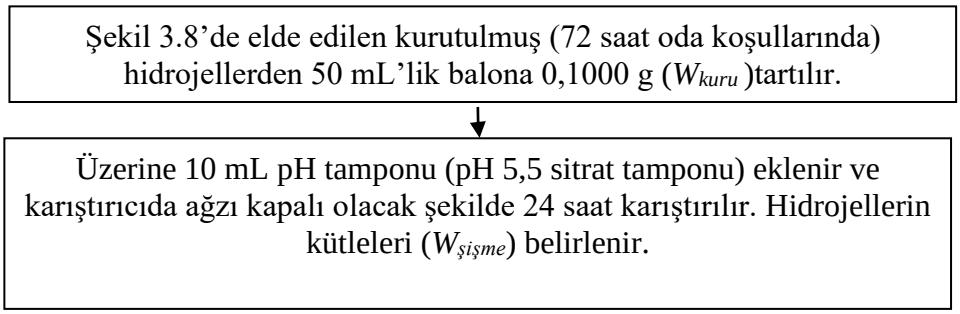
Kemometrik yöntemlerde yanıt değerlerinin belirlenmesi için elde edilen hidrojellerden galangin salınım çalışması yapılmıştır. Daha sonra galangin miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Salınım çalışmasının planı Şekil 3.9'da anlatılmıştır.



Şekil 3.9. Salınım çalışması için analiz şeması

Hidrojellerin fizokimyasal ve yapısal analizleri

Hidrojellerin fizikokimyasal olarak şişme testi analizi yapılmıştır (Şekil 3.10). Şişme testi için şişme oranı (%) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. Şişme oranı testi için analiz şeması

$$şişme\ oranı\ (\%) = \frac{ıslak\ kütle(W_{şişme}) - kuru\ kütle\ (W_{kuru})}{kuru\ kütle\ (W_{kuru})} \times 100 \qquad (3.3)$$

Yapısal analizleri için fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) ile analiz Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde hizmet alımı

şeklinde yapılmıştır. Hidrojellerin yüzeyleri hakkında bilgi edinmek için SEM (Taramalı elektron mikroskobu) analizleri, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde bulunan taramalı elektron mikroskobu ile hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.2.7. Anti-tirosinaz enzim aktiviteleri

Çizelge 3.11'de gösterilmiş olan örneklerin her birinin IC50 (Enzim'in %50'sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanmasında çalışıldığı miktarlar verilmiştir. Bu örnekler 5 mL dimetilsülfoksit çözeltisinde çözülerek hazırlandı. Her bir örneğin anti-tirosinaz enzim aktiviteleri için Çizelge 3.12'deki değerleri kullanılmıştır. 100 µL örnek, 1000 µL L-DOPA, 3400 µL pH 6,80 tamponu eklenir ve karıştırılır. En son 500 µL tirozinaz enzimi eklenir ve 1 dk boyunca karıştırılır. Daha sonra 450 nm'de UV-VIS spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri yapılır. Elde edilen absorbans değerleri eşitlik 3.4'teki formülde yerlerine konularak %inhibisyon değerleri hesaplanır Standart olarak kojik asit çözeltisi kullanılmış belirli konsantrasyonlara karşı %inhibisyon değerlerini en küçük kareler yöntemi ile kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

Çizelge 3.11. IC50 değerleri belirlenecek örnekler ve kullanıldığı miktarlar

Örnek	**Miktar (mg)**
Havlıcan ekstraktı katısı (EtOH)	10,15
Havlıcan ekstraktı Katısı (MeOH)	10,21
Hidrojel	99,41
Hidrojelli krem	1121,71
Havlıcanlı krem	1103,79
C. vulgaris içeren krem	1227,00
C. vulgaris katısı	51,33
Krem	1036,86

$$\%İnhibisyon = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} x100 \quad (3.4)$$

Eşitlik 3.4'te bulunan A, B, C ve D değerlerinin elde edilmesi Çizelge 3.12'de verilmiştir. Her biri 450 nm'de örneklerin okunan absorbans değerleridir.

Çizelge 3.12. A, B, C ve D çözelti hacimleri

Örnekler	**L-DOPA**	**pH 6,80 tampon çözeltisi**	**Kojik asit**	**Tirosinaz**
A	1000 µL	3500 µL	500 µL	-
B	1000 µL	4000 µL	-	-
	L-DOPA	**pH 6,80 tampon çözeltisi**	**Örnek**	**Tirosinaz**
C	1000 µL	3400 µL	100 µL	500 µL
	L-DOPA	**pH 6,80 tampon çözeltisi**	**Örnek**	**Tampon**
D	1000 µL	3400 µL	100 µL	500 µL

Çizelge 3.13. %İnhibisyon kalibrasyon verileri

Yöntem	**Derişim aralığı (µM)**	**Doğru Denklemi**	**Regresyon katsayısı (R^2)**
%İnhibisyon	1-20	y = 3,0130x + 9,9540	0,9940

4. BULGULAR

Tezde sunulan bulguları beş ana başlık altında inceleyeceğiz. Bunlar;

- Spektroskopik sonuçlar
- Kromatografik sonuçlar
- Saflaştırma sonuçları
- Kemometrik sonuçlar
- Anti-tirosinaz enzim aktiviteleri

4.1. Spektroskopik Sonuçlar

Havlıcan ekstraktlarının spektroskopik tayinleri için (toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite) bulunan sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Spektroskopik bulgular

Ekstrakt türü	**Folin-Ciocalteu** (mg GAE/g örnek)	**ABTS** (mg TE/görnek)	**CHROMAC** (mg TE/g örnek)
%80 Etanol	363,558± 0,738	113,607 ± 5,122	282,622 ± 4,743
%80 Metanol	224,124 ± 0,092	78,836 ± 4,870	41,463 ± 0,862
%50 Etanol	266,470 ± 0,369	99,666 ± 3,598	223,171 ± 0,862
%50 Metanol	188,499 ± 0,461	68,292 ± 3,172	79,878 ± 0,862

4.2. Kromatografik Sonuçlar

HPLC-DAD cihazı için havlıcan bitkisinde bulunan fenolik madde miktarları tayininde kullanılan galangin (360 nm), *p*-kumarik asit (320 nm), kuersetin (360 nm) ve kamferol (360 nm) fenolik standartlarından 1-20 mg/L konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiş ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon çalışmaları için fenolik maddelerin geri kazanım çalışmaları da yapıldı. Ekstraksiyon yönteminde içerisinde 10 mg/L galangin ve 1 mg/L kamfeol, kuersetin ve p-kumarik asit içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Bunun için geri kazanım çalışmaların %80 etanol ve %80 metanol ekstraktları kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. HPLC-DAD için hazırlanan fenolik maddelerin kalibrasyon grafikleri

Fenolik Madde	**Kalibrasyon denklemi**	**R^2**	**LOQ (mg/L)**	**LOD (mg/L)**	**Geri kazanım (%) / Ekstraksiyon türü**
Galangin (32,67 dk)	y = 57,77x + 1,30	0,998	0,0513	0,0154	95,63 ± 1,75 /EtOH
					96,11 ± 0,24 /MeOH
p-kumarik asit (24,16 dk)	y = 131,20x + 5,03	0,999	0,2737	0,0821	88,85 ± 3,56 /EtOH
					82,45 ± 0,11 /MeOH
Kuersetin (27,90 dk)	y = 78,23x – 32,59	0,998	0,1603	0,0481	93,23 ± 4,77 /EtOH
					90,58 ± 2,34 /MeOH
Kamferol (29,40 dk)	y = 78,35x – 16,96	0,998	0,0747	0,0224	97,06 ± 0,09 /EtOH
					100,55 ± 0,26 /MeOH

Çizelge 4.3. Havlıcan ekstraktlarında bulunan fenolik madde miktarları

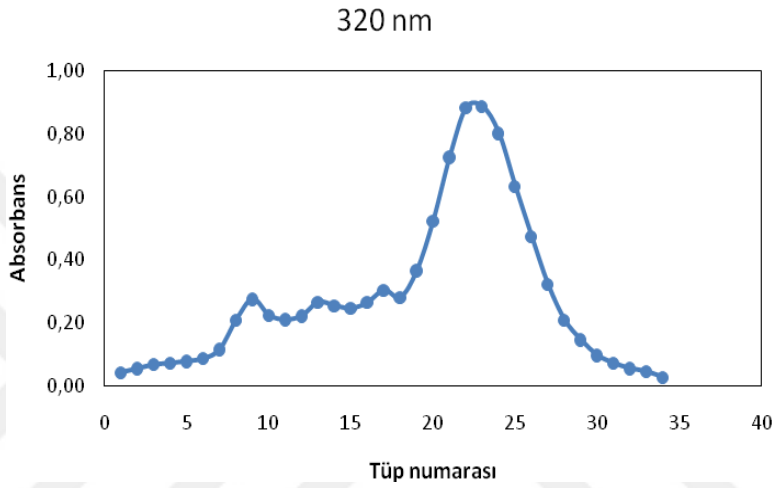
Ekstraksiyon türü	Galangin (mg/g)	*p*-kumarik asit (mg/g)	Kuersetin (mg/g)	Kamferol (mg/g)
%50 Etanol	10,2368 ± 0,0461	0,0048 ± 0,0004	0,0613 ± 0,0019	0,2112 ± 0,0018
%80 Etanol	11,4343 ± 0,0729	0,0061 ± 0,0001	0,0612 ± 0,0015	0,2199 ± 0,0015
%50 Metanol	9,9447 ± 0,3770	0,0031 ± 0,0002	0,0534 ± 0,0001	0,0762 ± 0,0022
%80 Metanol	10,4906 ± 0,1146	0,0031 ± 0,0002	0,0604 ± 0,0001	0,1968 ± 0,0018

HPLC-DAD cihazında hazırlanan fenolik bileşiklerin kalibrasyon grafikleri ile havlıcan bitkisinde bulunan galangin, *p*-kumarik asit, kamferol ve kuersetin fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

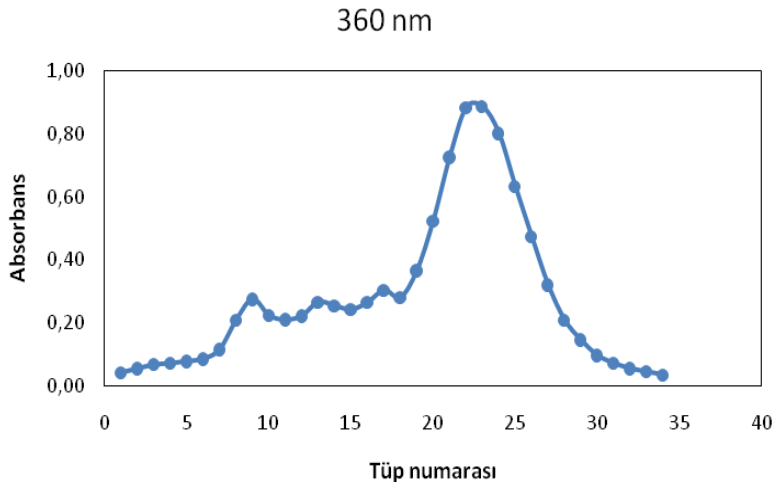
Havlıcan bitkisindeki fenolik madde miktarları kalibrasyon grafiğinden hesaplanmış ve sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

4.3. Saflaştırma Çalışmaları

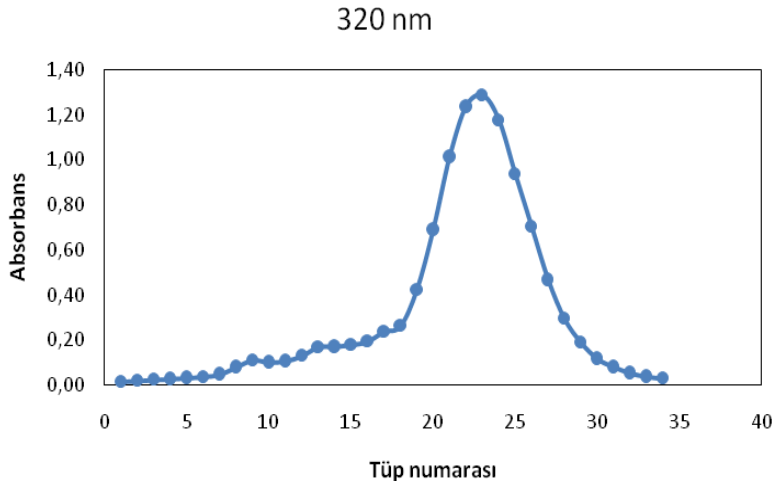
%80 etanol (v/v) ve %80 metanol (v/v) havlıcan ekstraktından ayrı ayrı 10 mL alınarak kolondan geçirildi. 100 mL metanol geçirilerek fraksiyonlar (3 mL) toplandı. Herbir fraksiyondan 0,1 mL alınıp 4,9 mL metanol ile seyreltildi ve UV-VIS spektrofotometresinde 320 ve 360 nm'de absorbanslar ölçüldü. 320 ve ve 320 nm'de fraksiyonların absorbans değerleri verilmiştir.



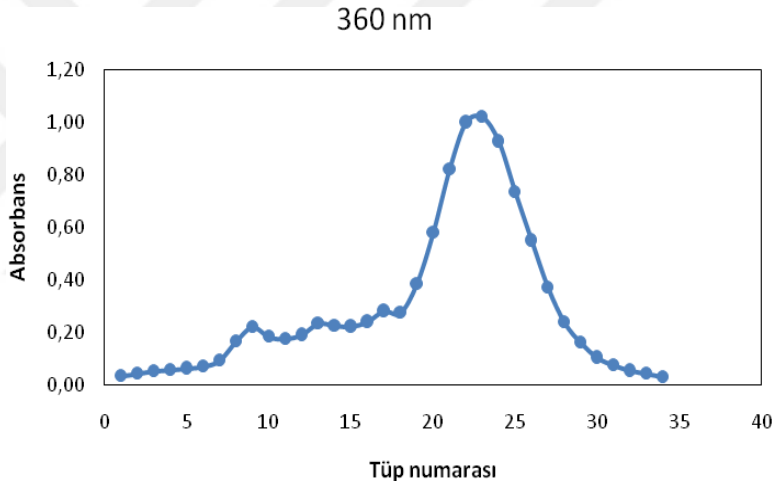
Şekil 4.1. 320 nm'de etanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği



Şekil 4.2. 360 nm'de etanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği

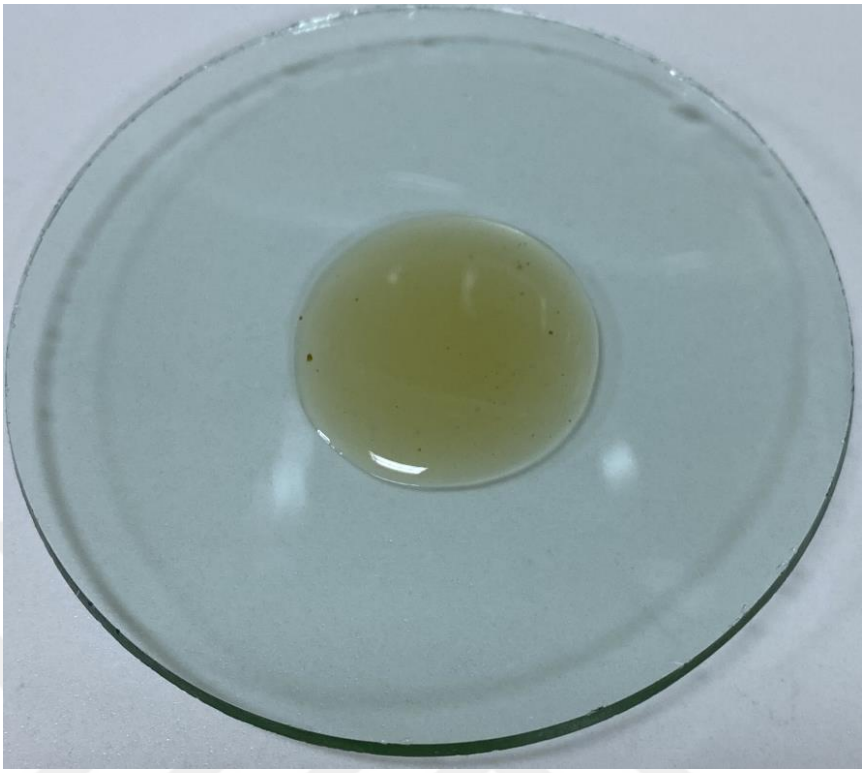


Şekil 4.3. 320 nm'de metanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği



Şekil 4.4. 360 nm'de etanol ekstraktının fraksiyon/absorbans grafiği

Her iki ekstraktın fraksiyonları 15-34 nolu tüpler birleştirildi ve döner buharlaştırıcı ile çözücü uzaklaştırıldı. Elde edilen kalıntılardan 0,0805 g etanol ekstrakt ve 0,0305 g metanol ekstrakt kalıntısı elde edildi. Etanol ekstrakt kalıntısı daha fazla olduğu için havlıcanlı krem çalışmalarında kullanıldı. Bu elde edilen kalıntıların HPLC-DAD ile analizleri yapıldı. Saflaştırma işlemi sonrası etanol kalıntısında 0,4454 mg/g kuersetin, 3,2345 mg/g kamferol, 217,056 mg/g galangin, 0,0102 mg/g *p*-kumarik asit, metanol kalıntısında 0,3885 mg/g kuersetin, 3,0028 mg/g kamferol, 215,4150 mg/g galangin, 0,0117 mg/g *p*-kumarik asit bulundu. Havlıcanlı kreminin görüntüsü Şekil 4.5'te verilmiştir.



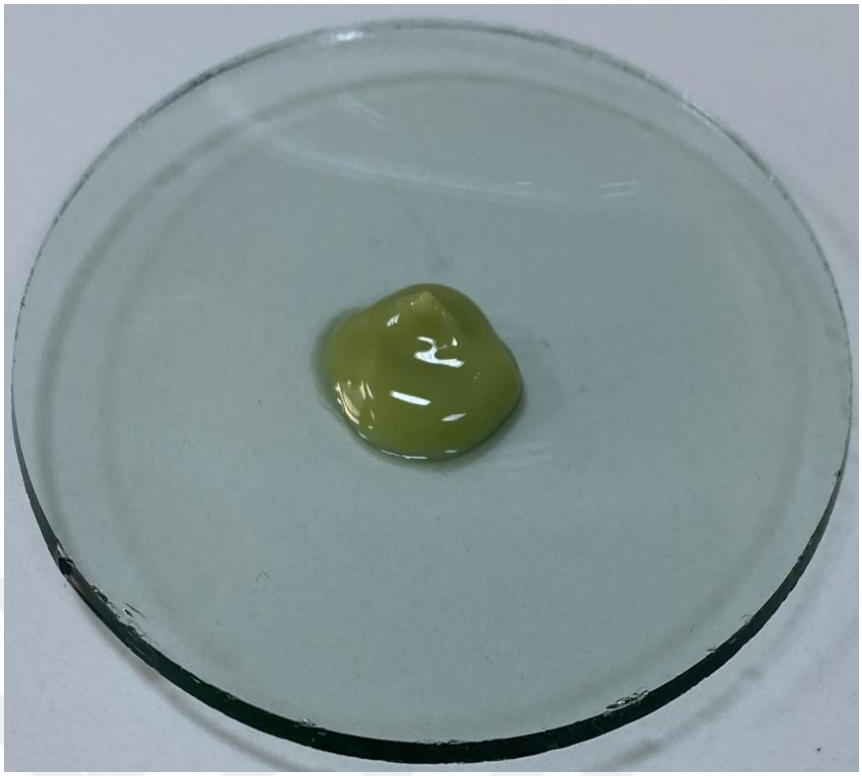
Şekil 4.5. Havlıcanlı yüz kremi

Krem çalışmalarında ayrıca *Chlorella vulgaris* ekstraktı da kullanılmıştır (Şekil 4.6). Daha sonra hem krem örneklerinde hem de *Chlorella vulgaris* ekstraktında spektroskopik çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Spektroskopik bulgular

Örnek	**Folin-Ciocalteu** (mg GAE/g örnek)	**ABTS** (mg TE/g örnek)	**CHROMAC** (mg TE/g örnek)
C. vulgaris ekstraktı	84,263±0,794	17,314±0,120	69,007±0,086
Krem	0,047±0,001	0,136±0,003	0,332±0,012
C.vulgaris içeren krem	2,235±0,006	1,751±0,055	10,913±0,214
Havlıcan krem	0,279±0,022	0,242±0,004	0,874±0,036

Ayrıca *C.vulgaris* ekstraktında bulunan karotenoidler HPLD-DAD ile analiz edilip miktarları belirlenmiştir. Buna göre *C.vulgaris* ekstraktında 0,1302±0,0002 mg/g lutein bulunmuştur.



Şekil 4.6. *Chlorella vulgaris* krem formu

4.4. Kemometrik Çalışmalar

Çizelge 3.8 ve 3.9'da verilen seviyelere göre Şekil 3.8'de belirtilen işlem basamaklarına göre 30 hidrojel örneğinden galangin salınım çalışması yapılmıştır. Daha sonra hidrojellerden salınan galangin miktarları HPLC-DAD ile belirlenmiştir. Elde edilen 30 hidrojel için galangin salınım değerleri kullanılarak Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı ile ANOVA analizi yapılmıştır. Merkezi kompozit dizayn yöntem ile bulunan tahmini galangin salınım değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Ayrıca (Çizelge 4.6) bulunan ikinci dereceden denklemler ile tahmini değerler hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.5. Kemometrik deneysel ve tahmini değerler

Deney	Salınan galangin derişimi (mg/L)	
	Deneysel değerler	**Tahmini değerler**
1	2,65	2,49
2	1,52	1,33
3	2,29	2,34
4	1,30	1,55
5	3,16	3,35
6	2,39	2,06
7	2,13	1,88
8	0,95	0,96
9	3,26	3,22
10	2,09	2,34
11	3,15	3,49
12	3,19	2,98
13	3,67	3,43
14	2,50	2,43
15	2,20	2,38
16	1,57	1,75
17	3,93	3,90
18	2,06	2,11
19	3,00	3,30
20	2,75	2,47
21	2,35	2,20
22	1,66	1,82
23	0,63	0,84
24	2,54	2,35
25	2,86	2,76
26	2,86	2,76
27	2,31	2,76
28	2,84	2,76
29	3,08	2,76
30	2,63	2,76

Çizelge 4.6. Kemometrik yanıt değerleri için ANOVA analizi sonuçları

Yöntem	**Galangin salınım derişimi (R^2 =0,9214)**				
	DF	SS	MS	F değeri	*P* değeri
Model	14	15,58	1,11	12,56	< 0,0001
Lack of fit	10	0,98	0,098	1,43	0,3641
Pure error	5	0,34	0,069		

DF: serbestlik derecesi, SS: karelerin toplamı, MS: ortalamaların karesi

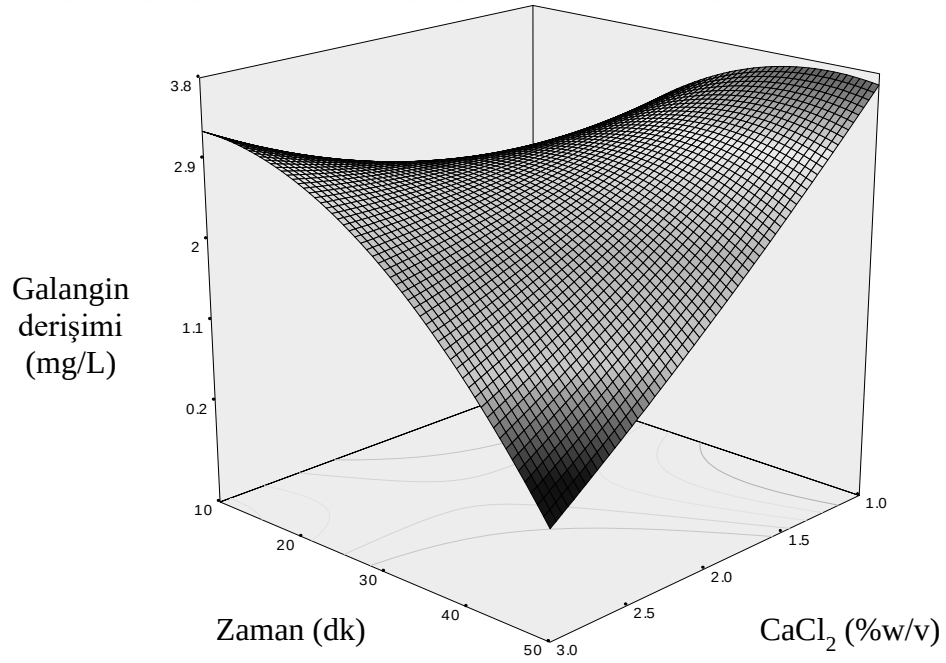
Çizelge 4.7. Kuadratik polinom denklemleri (x_1:Na-Al yüzdesi (%w/v), x_2:$CaCl_2$ yüzdesi (%w/v), x_3:Zaman (dk), x_4:Ekstrakt yüzdesi (%w/v))

Yanıt	Kuadratik polinom denklemi
Salınan galangin miktarı	$y = 2{,}76 - 0{,}45x_1 - 0{,}21x_2 - 0{,}094x_3 + 0{,}38x_4 - 0{,}33x_2x_3 - 0{,}16x_3x_4 - 0{,}19x_3^2 - 0{,}29x_4^2$

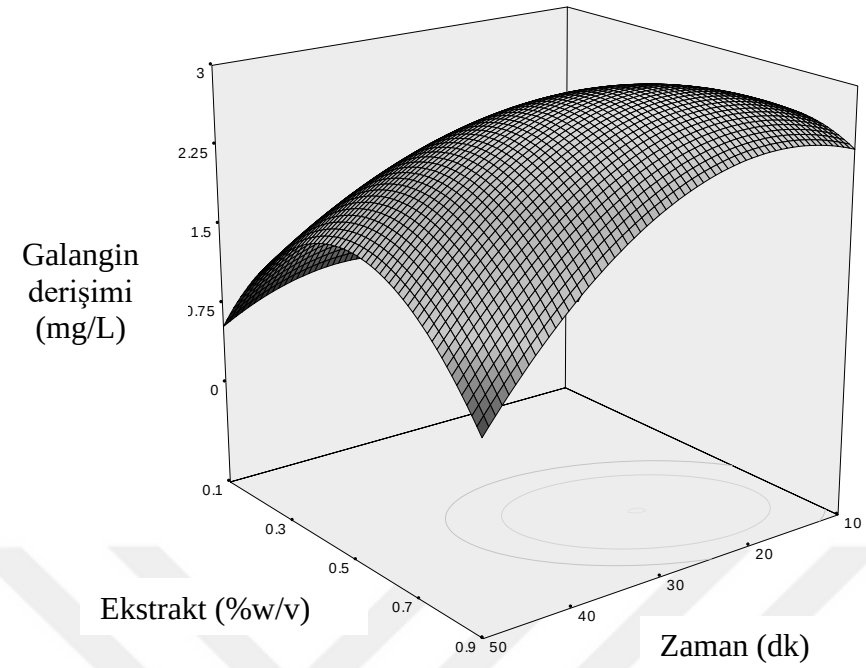
Çizelge 4.8. Kemometrik optimum koşullar ve deneysel/tahmini değerler

Faktör	**Optimum koşullar**	**Maksimum salınan galangin derişimi (mg/L)**	
		Tahmini değer	**Deneysel değer**
Na-Al (%w/v)	0,69	4,97	5,02±0,10
$CaCl_2$ (%w/v)	1,00		
Zaman (dk)	43,55		
Ekstrakt (%w/v)	0,48		

Galangin-aljinat hidrojellerinin hazırlanması için kemometrik yöntemlerden merkezi kompozit dizayn kullanılmıştır. Yapılan ANOVA analizine göre salınan galangin derişimi sonuçları üzerinde faktörlerin etkisini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.7a ve 4.7b'de verilmiştir.



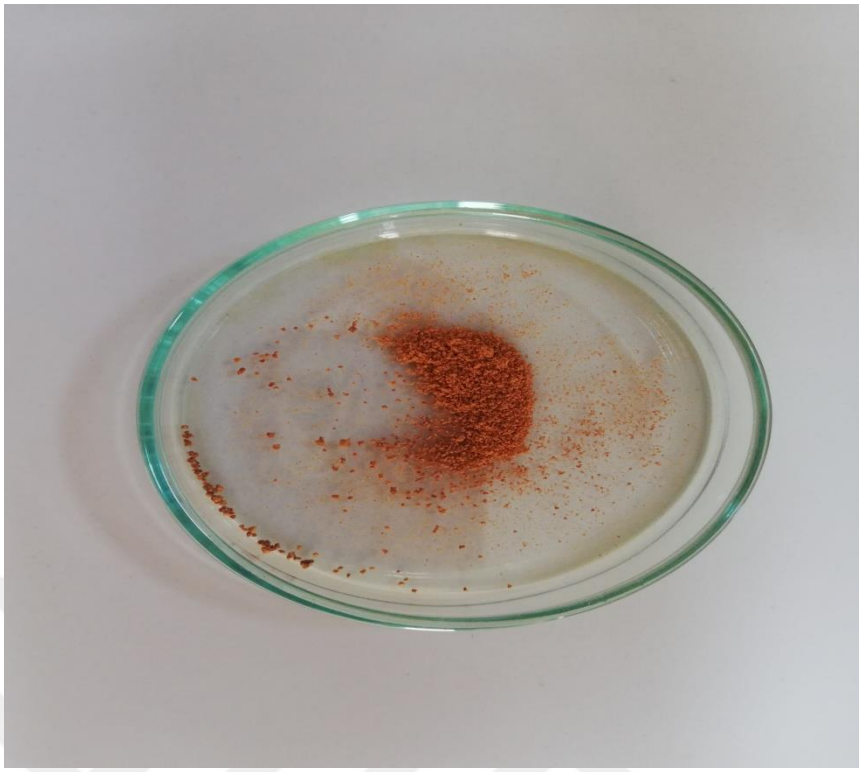
Şekil 4.7a. Kemometrik yüzey analizi grafikleri (Zaman- $CaCl_2$ etkisi)



Şekil 4.7b. Kemometrik yüzey analizi grafikleri (Zaman-Ekstrakt etkisi)

Hidrojellerin fizikokimyasal ve yapısal analizleri

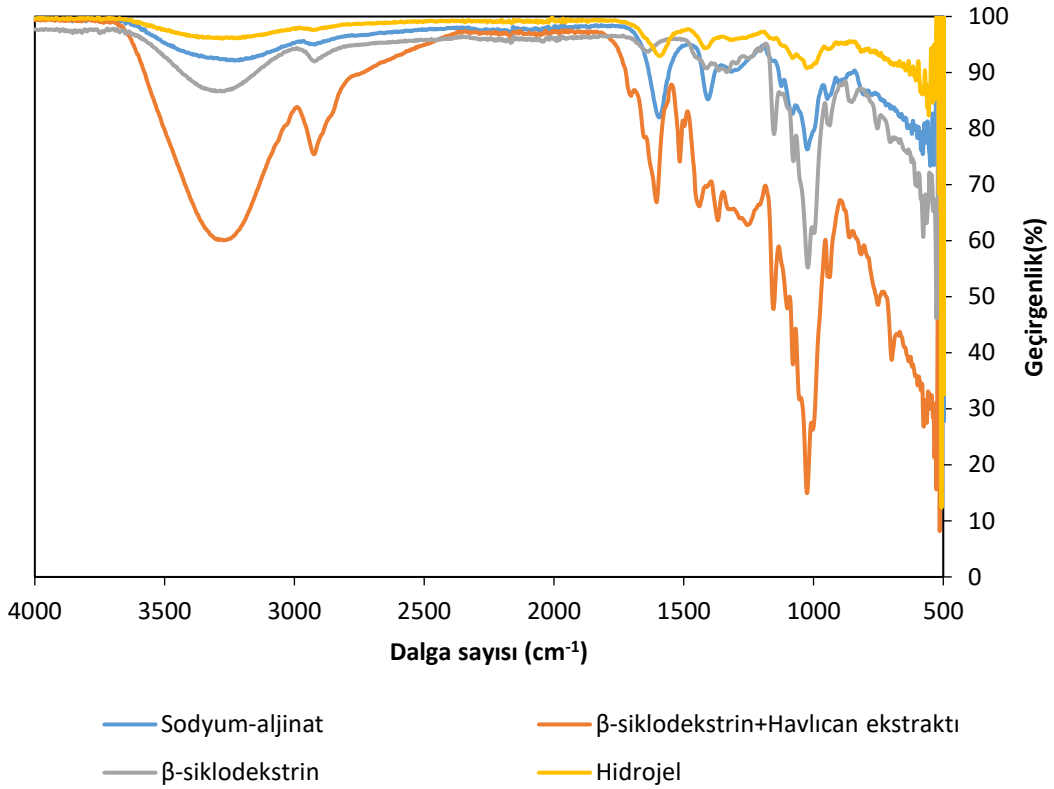
Kemometrik yöntem çalışmaları için ilk önce havlıcan ekstraktı β-siklodekstrin ile enkapsule edildi. Enkapsulasyon sonrası elde edilen galangin-β-siklodekstrin kalıntısının görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir. Bu kalıntı kullanılarak hazırlanan hidrojellerin görüntüsüde Şekil 4.9'da verilmiştir. Elde edilen hidrojeller için FT-IR spektrumu (Şekil 4.10), hem galangin-β-siklodekstrin kalıntısının (Şekil 4.11-13) hem de hidrojelin (Şekil 4.14-16) SEM görüntüleri de verilmiştir.



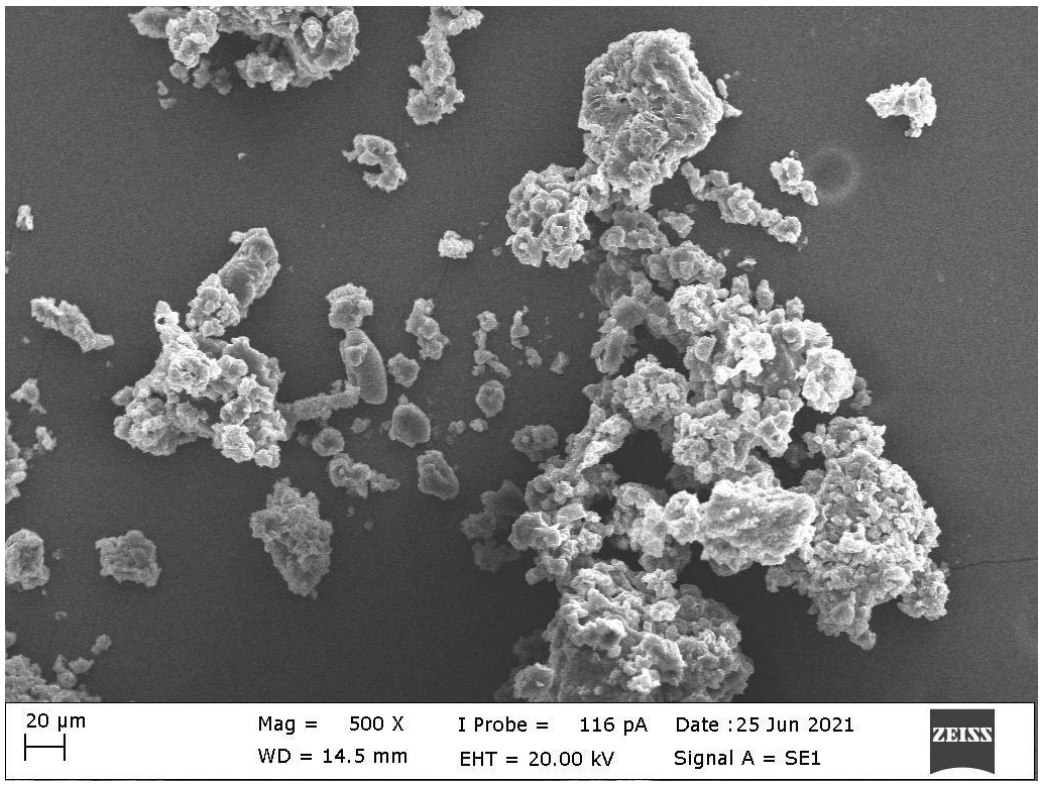
Şekil 4.8. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının görüntüsü



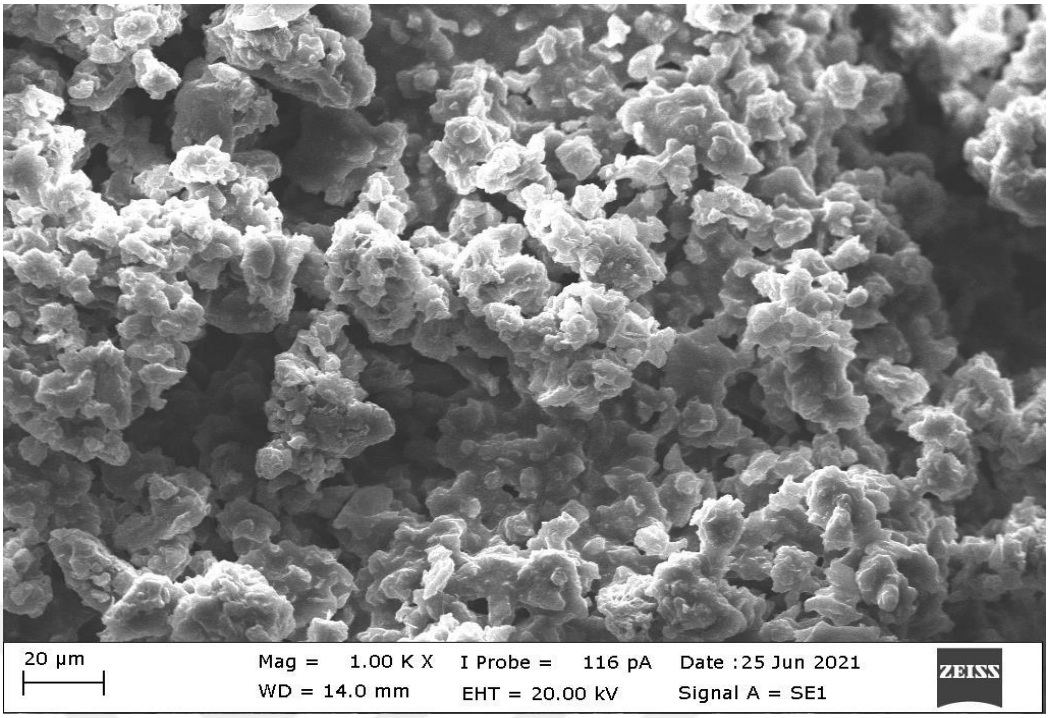
Şekil 4.9. Hidrojel görüntüsü



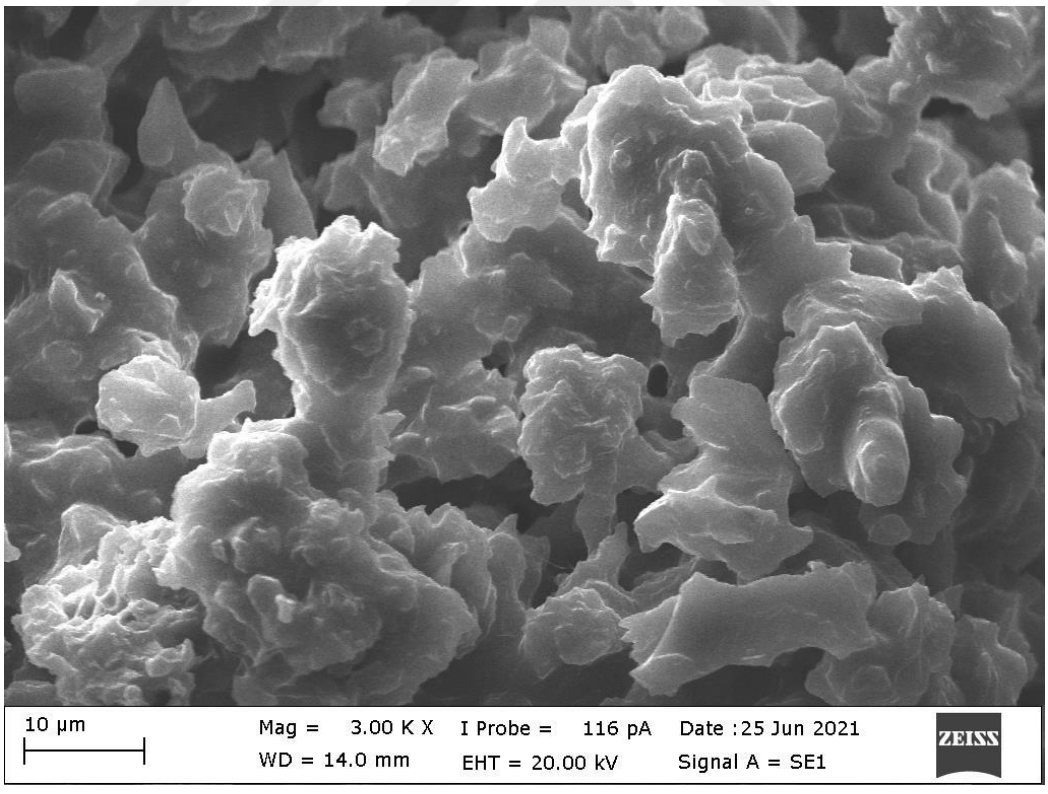
Şekil 4.10. Sodyum aljinat, ß-siklodekstrin+havlıcan ekstraktı, ß-siklodekstrin ve hidrojelin FTIR spektrumları



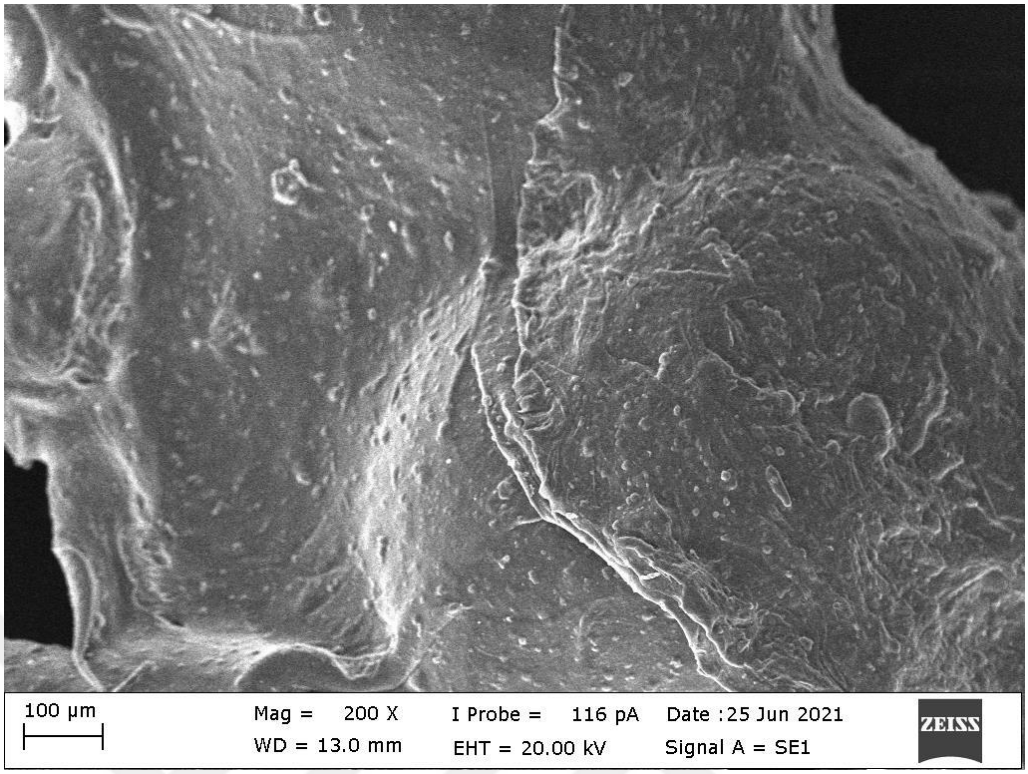
Şekil 4.11. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının SEM görüntüsü (500 büyütme)



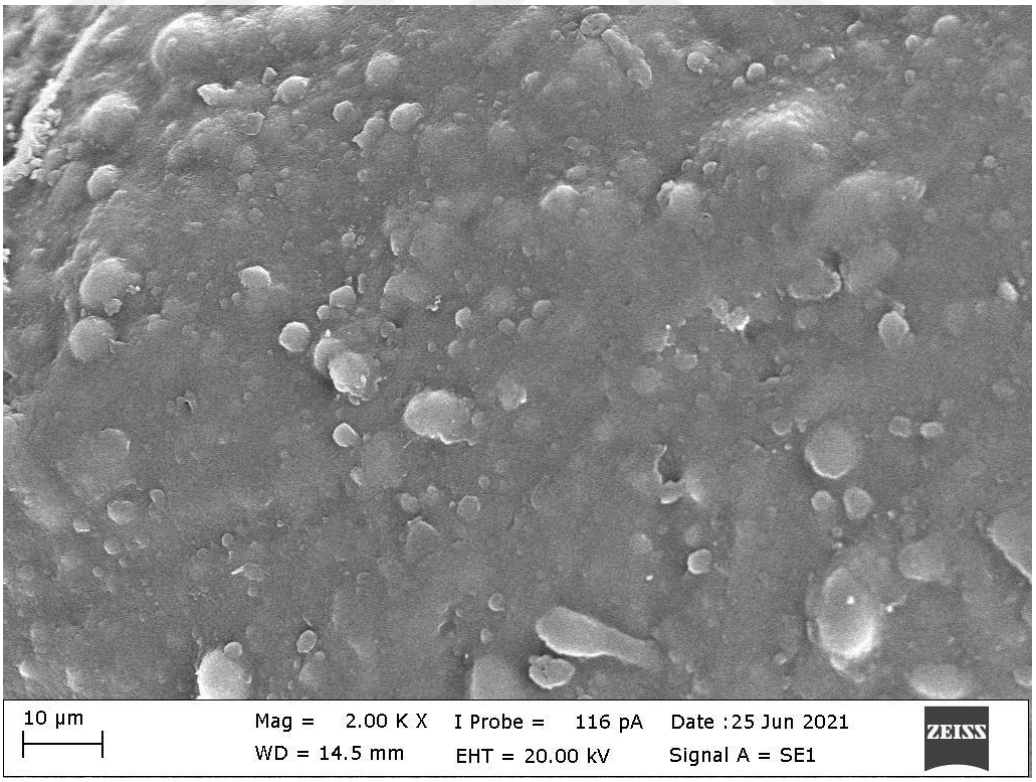
Şekil 4.12. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının SEM görüntüsü (1000 büyütme)



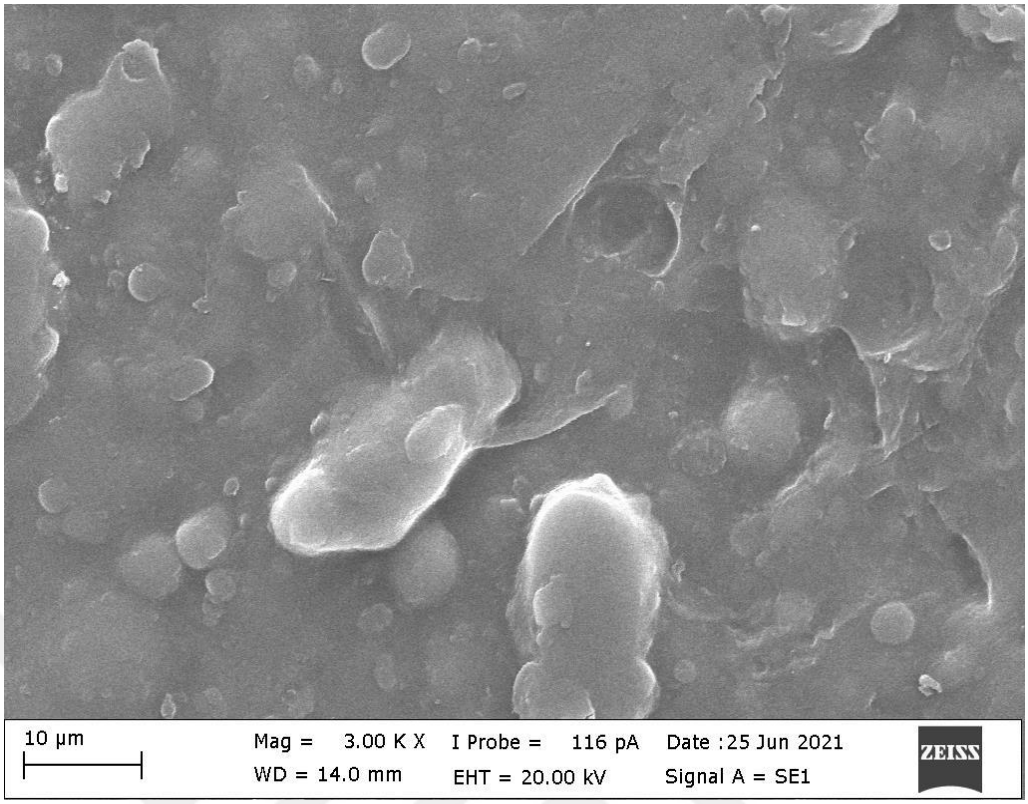
Şekil 4.13. Galangin-β-siklodekstrin kalıntısının SEM görüntüsü (3000 büyütme)



Şekil 4.14. Hidrojel SEM görüntüsü (200 büyütme)



Şekil 4.15. Hidrojel SEM görüntüsü (2000 büyütme)



Şekil 4.16. Hidrojel SEM görüntüsü (3000 büyütme)

Hidrojellerin fizikokimyasal olarak şişme testi analizi yapılmıştır. Şişme testi için şişme oranı (%) hesaplanıp Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Şişme oranları

Örnek	**Şişme oranı (%)**
Galangin-aljinat hidrojeli	7928±384

4.5. Anti-tirosinaz enzim aktivite çalışmaları

Örneklerin anti-tirosinaz enzim aktiviteleri ölçülerek örneklerin melanin inhibisyonu konusunda IC50 değerleri bulunmuştur. Çizelge 3.11'deki örneklerin absorpsiyon değerleri eşitlik 3.4'te yerine konularak tirosinaz inhibisyon analiz (IC50) değerleri bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Örneklerin IC50 değerleri

Örnek Adı	**IC50 Değeri (mg/mL)**
Havlıcan ekstraktı katısı (EtOH)	0,446±0,040
Havlıcan ekstraktı Katısı (MeOH)	0,074±0,001
Hidrojel	1,076±0,029
Hidrojelli krem	6,656±0,170
Havlıcanlı krem	4,027±0,212
C. vulgaris içeren krem	5,488±0,135
C. vulgaris katısı	0,308±0,006
Krem	5,644±0,052
Kojik asit	0,0019

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antioksidan özelliği içeren kremlerin geliştirilmesi konusunda yapılan tez çalışmamız beş ana başlık altında toplanabilir. Bunlar;

• Spektroskopik yöntemler
• Kromatografik yöntemler
▪ Saflaştırma çalışmaları
▪ Kemometrik çalışmalar
▪ Anti-tirosinaz enzim aktivite çalışmaları

5.1. Spektroskopik Yöntemler

Yapılan araştırmalar incelendiğinde antioksidan özelliklerin belirlenmesinde spektroskopik yöntemler adı altında genel olarak Folin-Ciocalteu, CHROMAC, FRAP, CUPRAC, ABTS ve DPPH gibi yöntemler kullanılmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmamızda toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu, antioksidan özelliğinin belirlenmesinde ABTS ve CHROMAC yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerde çözücü ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, ekstraksiyon oranları %80 etanol, %80 metanol, %50 etanol ve %50 metanol ekstraksiyonlarıyla çalışılmış ve en yüksek sonuçlar %80 etanol ekstraktlarında bulunmuştur. Tez kapsamında çalışılan havlıcan örneğinin %80 etanol, %80 metanol, %50 etanol ve %50 metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 363,558±0,738; 224,124 ± 0,092; 266,470±0,369; 188,499±0,461 mg GAE/g olarak hesaplanmıştır. Mayachiew ve Devahastin (2008), havlıcan üzerinde yapılan toplam fenolik madde içeriği 40,9±0,2 mg GAE/g olarak bulmuştur. Bu çalışmada ekstraksiyon koşullarının ve ekstrakt içeriğinin farklı olması vb. nedenlerden dolayı sonuçların farklılık gösterdiği, çalışma sonuçlarının daha yüksek bulunduğu belirlenmiştir. %80 etanol, %80 metanol, %50 etanol ve %50 metanol ekstraktlarının antioksidan kapasite sonuçları sırasıyla 113,607±5,122; 78,836±4,870; 99,666±3,598 ve 68,292±3,172 mg TE/g olarak bulunmuş olup, en yüksek değer %80 etanol ekstraktında elde edilmiştir. Ayusuk ve ark. (2009) yaptığı çalışmada, havlıcan bitkisi üzerinde yapılan ABTS antioksidan kapasite değeri 167,48 ± 5,19 μmol TE/g (41,918 mg TE/g) olarak bulmuştur. Buna göre farklı sonuçların bulunması örneğin toplandığı coğrafya ve

ekstraksiyon işlemleri (sıcaklık, süre vb) gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Genel olarak literatüre bakıldığında galangin maddesi havlıcanda bulunan temel fenolik madde olup suda çözünürlüğü azdır. Yapılan ekstraksiyon çalışmalarında da su miktarı arttıkça toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri azaldığı gözlenmiştir. Ekstraktlarda bulunan galangin miktarının da toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerlerine olan katkısı da çözünürlüğüne bağlı olarak değişmektedir. Tez kapsamında hazırlanan *Chlorella vulgaris* ekstraktının da toplam fenolik madde (84,263±0,794 mg GAE/g örnek) ve antioksidan kapasite (17,314±0,120 mg TE/g örnek ABTS yöntemi, 69,007±0,086 mg TE/g örnek CHROMAC yöntemi) çalışmaları da yapılmıştır. Habashy ve ark. (2018) yaptığı çalışmada, *Chlorella vulgaris* mikroalgi için toplam fenol tayin miktarı 5,18 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Agregán ve ark. (2018) yaptığı çalışmada ise, *Chlorella vulgaris* mikroalginin antioksidan kapasite değeri 15,64 mg TE/g olarak bulunmuştur. Tez kapsamında hazırlanan ekstraktların toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite miktarları literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında farklı sonuçların elde edildiği gözlemlenmiştir. Havlıcan ve *Chlorella vulgaris* türünün yetiştiği coğrafi bölgelerin farklı olması, iklim koşulları, bulundukları çevre, saklama koşulları, örnek hazırlama teknikleri ve ekstraksiyon koşulları gibi faktörlerde örneklerin fenolik madde içeriğini etkilemektedir. Doğal ürünlerde bulunan antioksidan maddelerin kimyasal özellikleri, çözünürlükleri, stabiliteleri farklı olduğu için uygulanan antioksidan kapasite tayin yöntemlerinde farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu nedenle tez çalışmamızda antioksidan kapasite tayin yöntemi olarak CHROMAC yöntemi de kullanılmıştır. CHROMAC ve ABTS yöntemlerine göre sonuçların farklı olması farklı ortam koşullarında antioksidan maddelerin özellikleri de değişmektedir. Bu nedenle sonuçlarda farklılık gözlenebilmektedir. Nasir ve ark. (2017) yaptığı çalışmada, *Chlorella vulgaris* için antioksidan kapasite değeri (325,26±1,93 mg TE/g) sonuçlarımızdan yüksek bulunmuştur. Ekstraksiyonda kullanılan çözücüler, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, kullanılan mikroalgin toplandığı coğrafi bölge, antioksidan yöntem öncesi yapılan diğer yöntemler bu değerin farklı olmasının sebebi olabilir.

5.2. Kromatografik Yöntemler

Bu çalışmada zencefil familyasından olan havlıcan (*Alpinia officinarum*) içerisinde bulunan fenolik maddeler HPLC-DAD cihazı ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Havlıcan ekstraktlarında HPLC-DAD ile tayin edilen fenolik maddeler; galangin, kamferol, kuersetin ve *p*-kumarik asittir. Havlıcanda bulunan fenolik maddelerin kalibrasyon denklemi, LOD, LOQ ve %geri kazanım değerleri Çizelge 4.2'de, fenolik madde miktarları ise Çizelge 4.3'de verilmiştir. Havlıcanın 2 farklı çözücü (metanol ve etanol) kullanılarak 4 farklı polarite ortamında ekstraksiyon yapılmıştır. Bu yapılan ekstraksiyonlarda en iyi verimi %80'lik etanol çözeltisinden elde edilmiştir. Çözücü ekstraksiyonu doğal ürünlerde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyonu için kullanılan en genel ekstraksiyon yöntemidir. Fenolik maddeler için daha çok su, metanol, etil asetat, aseton ve bunların farklı karışımları çözücü olarak kullanılmaktadır. Fenolik maddelerin ekstraksiyon verimleri bu fenolik maddelerin kullanılan çözücülerdeki çözünürlüğüne bağlıdır. Bu nedenle tez kapsamında farklı çözücü karışımları kullanılarak ekstraksiyon çalışması yapılmış ve havlıcan için en uygun çözücü %80 etanol olarak belirlenmiştir. *Chlorella vulgaris* ekstraktında ise HPLC-DAD yöntemi ile 0,1302±0,0002 mg/g lutein bulunmuştur. Bu sonuç Nasir ve ark. (2017) yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

5.3. Saflaştırma çalışmaları

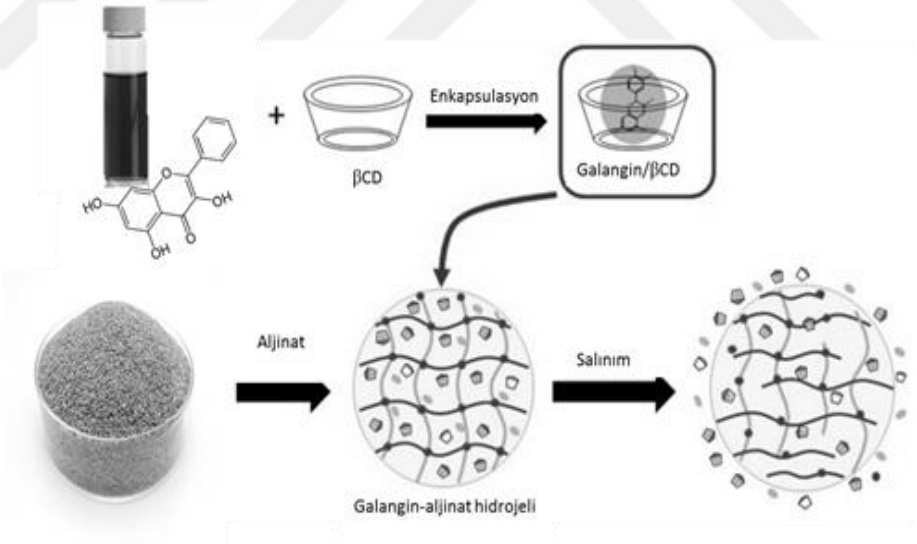
Saflaştırma çalışmalarında havlıcan için, en yüksek fenolik madde ve toplam fenolik madde içeriğine sahip antioksidan özelliği yüksek %80 etanol ve metanol ekstraktları kullanılmıştır. Bu ekstraktların Sephadex LH-20 kolon kromatografisi saflaştırma çalışmaları sonucu havlıcan için dört fraksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.1-4.2-4.3-4.4.). Sephadex LH-20 kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarını 360 nm ve 320 nm'de absorbans ölçümleri yapıldıktan sonra tüp fraksiyonları birleştirilmiştir. Daha sonra HPLC-DAD cihazı ile kantitatif analizleri yapılmıştır. HPLC-DAD ile elde edilen sonuçlara göre saflaştırma işlemi sonrası etanol ekstraktında 0,4454 mg/g kuersetin, 3,2345 mg/g kamferol, 217,056 mg/g galangin, 0,0102 mg/g *p*-kumarik asit, metanol ekstraktında 0,3885 mg/g kuersetin, 3,0028 mg/g kamferol, 215,4150 mg/g galangin ve 0,0117 mg/g *p*-kumarik asit bulunmuştur. En yüksek saflaştırma sonucu

etanol ekstraktında 217,056 mg/g galangin bulunmuştur. Saflaştırma sonucu havlıcan için elde edilen en yüksek galangin içeriğine sahip etanol ekstraktından ve *C.vulgaris* ekstraktından elde edilen kalıntılar kullanılarak krem çalışmaları da yapılmıştır. Elde edilen örnekler için spektroskopik sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 4.4) kontrol olarak hazırlanan krem örneği ile karşılaştırıldığında antioksidan madde içeren kremlerin toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite sonuçları artmıştır. Buna göre havlıcan için elde edilen en yüksek galangin içeriğine sahip etanol ekstraktından ve *C.vulgaris* ekstraktından elde edilen kalıntılar kullanılarak hazırlanan kremler daha iyi etkinliğe sahip aday kozmetik ürün olabileceği sonucuna varılmıştır. CHROMAC sonuçlarına göre *C.vulgaris* ekstraktı eklendiğinde 30 kat, havlıcan ekstraktı eklendiğinde 3 kat antioksidan değerleri artmıştır.

5.4. Kemometrik Yöntemler

Hidrojel, birbirine çapraz bağlı polimerlerin oluşturduğu büyük karmaşık ve suda çözünmeyen yapılardır. Kontrollü aktif madde salınımı sağladıkları da pekçok alanda kullanımı tercih edilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda kozmetik kremde kullanılan galanginin hidrojelleri hazırlanarak krem çalışmasında kullanılabilirliği de araştırılmıştır. Bu amaçla galangin-aljinat hidrojelinde maksimum galangin salınımı için koşulların optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimum koşulların belirlenmesi için merkezi kompozit dizayn yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen kromatografik deneysel değerler ile tahmini değerler Çizelge 4.5'de verilmiştir. Tahmini ve deneysel değerlerin birbirleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Deneysel değerlere göre galangin derişimi 0,63 mg/L ile 3,93 mg/L arasında değişmektedir. Çizelge 4.6'ya bakıldığında galangin salınım derişiminin (4,97 mg/L) maksimum elde edilmesi için, optimum koşullar %0,69 (w/v) Na-Al, %1 (w/v) $CaCl_2$, %0,48 (w/v) ekstrakt ve 43,55 dk olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda yapılan hidrojelden elde edilen galangin salınım değeri de 5,02±0,1 bulunmuştur. Çizelge 4.6'da galangin salınım derişimi için *p*-değeri <0,0001 olarak bulunmuştur. *P*-değeri ile kuadratik polinom modelindeki yanıt ve değişkenler arasındaki ilişkiyi tanımlamada kullanılmış ve birbiriyle anlamlı olduğu bulunmuştur. Modelin F değeri 12,56 hesaplanmış %95 güven aralığında anlamlı kabul edilmiştir. Modelin lack of fit p-değeri 0,3641 olarak hesaplanmış modelin geçerli olduğunu göstermiştir. Hidrojel oluşumunda etkili faktörlerin (zaman, $CaCl_2$ yüzdesi ve

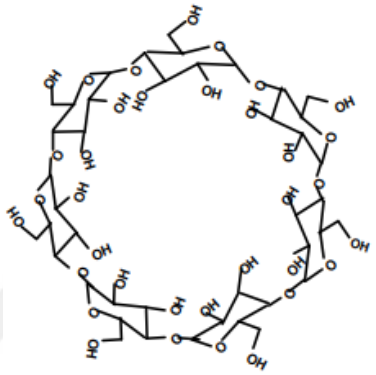
ekstrakt oranı) ANOVA yöntemine göre salınan galangin derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yüzey analiz grafikleri Şekil 4.7a ve Şekil 4.7b'de verilmiştir. Yüzey analiz grafiklerine göre zaman-$CaCl_2$ etkisi açısından bakıldığında zaman ve $CaCl_2$ yüzdesi arttıkça salınan galangin derişimi azalmaktadır. En iyi sonuç zamana karşı %1 $CaCl_2$ konsantrasyonunda elde edilmiştir. Zaman ve ekstrakt oranı açısından bakıldığında zaman azaldıkça salınan galangin derişimi azalmakta, ekstrakt oranı arttıkça salınan galangin derişimi parabolik olarak artıp azalmaktadır. En iyi sonuç zamana karşı %0,5 ekstrakt konsantrasyonunda elde edilmiştir. Çizelge 4.6'da galangin için yüksek regresyon katsayısı (R^2 = 0,9214) hesaplanmıştır. Çizelge 4.7'ye bakıldığında x_1 (Na-Al yüzdesi (%w/v)), x_2 ($CaCl_2$ yüzdesi (%w/v)), x_3 (Zaman (dk)), x_4 (Ekstrakt yüzdesi (%w/v)), x_2x_3, x_3x_4, x_3^2, ve x_4^2 en anlamlı değişkenler olarak bulunmuştur (p<0,05). Ancak x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_4, x_1^2 ve x_2^2 etkisi düşük değişkenler olarak bulunmuştur (p >0,05). Çalışmamızda havlıcandan izole edilen galanginin hidrojel yapımında kullanılmadan önce enkapsule edilmiştir (Şekil 5.1). Enkapsülasyon işlemi sırasında β-siklodekstrin (Şekil 5.2) kullanılmıştır.



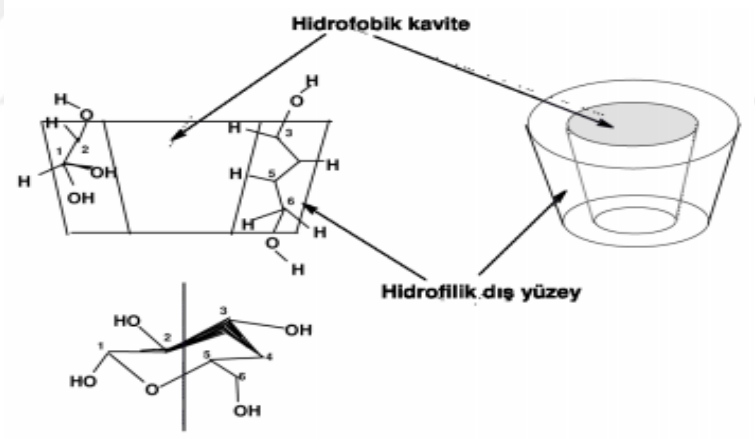
Şekil 5.1. Galangin-aljinat hidrojelinin hazırlanması

β-siklodekstrin (Şekil 5.2) kullanımının amacı, sudaki çözünürlüğü düşük olan galangin fenolik maddesi (havlıcandan izole edilen) ile bariyer oluşturarak galanginin hem korunmasını hem de çözünürlüğünü arttırmaktır. β-siklodekstrin üç boyutlu yapısında da (Şekil 5.3) görüldüğü gibi hidrofobik yüzeyi ile galangini kafes şeklinde sarıp, hidrofilik dış yüzeyi ile sudaki çözünürlüğü arttırmıştır. Siklodekstrinlerin 3 boyutlu

yapısı konik silindir görünümünde olan iç kısmı hidrofobik dış yüzey kısmı hidrofilik özellik taşımaktadır. Glikozil transferaz enziminin nişastayı parçalamasıyla β-siklodekstrin ve türevleri elde edilmektedir. İndirgen değildir, α(1-4) glikozidik bağ yapısına sahip siklik maltooligosakkaritlerdir. Siklodekstrinler gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Her yıl siklodekstrinlerin endüstride kullanım oranı %20 ile %30 arası artış göstermektedir.



Şekil 5.2. β-siklodekstrin yapısı



Şekil 5.3. Siklodekstrinlerin 3 boyutlu yapıları (Zhang ve Rees 1999)

Çizelge 5.1. Siklodekstrinlerin yardımcı madde olarak kullanım alanları

Kullanıldığı Alan	**Kullanım Amacı**
Isı, ışık ve oksijene duyarlı gıda ürünler	Koruyucu olarak
Kötü tat ve kokuları	Maskeleme
Aroma, vitamin, yağ asitleri	Stabilizasyonunda
Gıda bileşenlerinin	Kontrollü salınımı yapması
Süt ve süt ürünleri	Kolesterol uzaklaştırma
Vitaminler ve renk maddeleri	Çözünürlüğünün arttırılmasında

Siklodekstrinler %90'lara varan kullanım oranıyla en çok gıda endüstrisinde tercih edilmektedir. Bileşiklerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri enkapsülasyon işlemi ile önemli ölçüde korunabilmektedir. Siklodekstrinlerin kullanım alanları Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Hazırlanan galangin-aljinat hidrojelinin yapısal özelliklerinin belirlenmesi için FT-IR (Şekil 4.10) ve SEM (Şekil 4.11-16) analizleri de yapılmıştır. IR spektrumlarında 1500 cm^{-1} ve sağ tarafında kalan kısım parmak izi bölgesi 1500 cm^{-1} ve sol tarafında kalan kısım ise tanımlama bölgesi olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle moleküllerin kıyaslamasına bakarken genelde tanımlama bölgesine bakılmaktadır. Sodyum aljinatın IR spektrumuna bakıldığında; 3200-3300 cm^{-1} aralığında görülen bant O-H bağının varlığını, 2900 cm^{-1} frekansında görülen pik sp^3 hibritleşmesini, 2000 – 2500 cm^{-1} arasında dalgalanma halkalı yapının varlığını, 1600-1610 cm^{-1} arasındaki bantlar, O-C-O karboksilat asimetrik gerilme bantlarıdır. ß-siklodekstrinin IR spektrumuna bakıldığında; 3000 – 3700 cm^{-1} civarındaki geniş bant frekansı hidrojen bağı yani OH grubunun varlığını, 2900 cm^{-1} dalga sayısına karşılık gelen pik sp^3 hibritleşmesini, 2000 – 2500 cm^{-1} arasında dalgalanma halkalı yapının varlığını belirtmektedir. Hidrojel yapısının kızıl ötesi spektrumunda 3000 -3700 cm^{-1} arasında geniş bant spektrumu gözlenmekte yani hidrojen bağlı (OH) bir grubun varlığını, 2900 cm^{-1} küçük bir pik olmasına rağmen sp^3 hibritleşmesinin varlığını, 2000-2500 cm^{-1} aralığına gelen titreşimli piklerin halkalı yapıya ve 1500-1700 cm^{-1} aralığında bulunan pik alifatik ve aromatik çift bağları içerdiğini belirtmektedir.

ß-siklodekstrin-havlıcan ekstrakt karışımının spektrumuna bakıldığında, diğerleri ile aynı dalga sayılarında pikler gözlenmektedir. IR analizinde, spektrumlar karşılaştırıldığında, hemen hemen aynı dalga sayılarına yakın yerlerde pik elde edilmiştir. Bunun sebebi molekül yapıları aynı olmasa bile birbirlerine benzeyen yapılara ve bağlara sahiptirler. Dikkat etmemiz gereken en önemli husus ß-siklodekstrin-galangin karışımının diğerlerine göre kıyaslandığında geçirgenlik oranları daha düşük gözükmektedir. Bu da karışımın ışığı diğerlerine göre daha çok tutması (absorblaması) anlamına gelmektedir. Yapının güçlü bir kompleks yapıya dönüştüğünü

diğerlerine göre bağların daha kuvvetli olduğu ve ışığı daha çok absorpladığı anlamına gelmektedir.

Enkapsule edilen β-siklodekstrin-havlıcan yapısında daha çok kümelenmiş ve galanginin β-siklodekstrin tarafından sarıldığı görülmektedir. β-siklodekstrinn-havlıcan karışımınun görünümü daha çok dallanmış ağacı anımsatmaktadır. Burada dallanmış yapısının temel nedeni β-siklodekstrinin aromatik yapılarla kompleks oluşturma yeteneğine dayanmaktadır. Galangin-aljinat hidrojellerde ise yuvarlık ve gözenekli yapılar gözlenmektedir. Bu durum hidrojel yapısındaki aljinatın şişmeye dayalı fiziksel özelliğinden kaynaklanmaktadır.

5.5. Anti-tirosinaz enzim aktivite çalışmaları

Melanin, cildin dış faktörlere (zararlı güneş ışını, kirli hava vb.) maruz kalması ile meydana gelen cilt ton farklılıklarından sorumlu olan pigmenttir. Melaninin fazla sentezlenmesinden dolayı olan pigmentasyon reaksiyonlarının üretimini belirleyen kısım L-DOPA ile reaksiyon veren tirozinaz enzimidir. Burada tirozinaz enzimini inhibe ederek L-DOPA reaksiyonunda oluşacak dopakinon konsantre miktarını azaltarak doğru orantılı olarak melanin miktarını azaltacaktır ve ciltteki ton farklılıkların önüne geçilecektir.

Tez kapsamında yapılan farklı örnek üzerinde tirosinaz üzerindeki IC50 (Çizelge 4.10) sonuçlarına baktığımızda tirozinazın %50 inhibisyonu için en etkili olan kojik asit gözlenmektedir. Fakat kojik asitin uzun süre kullanımlarında yan etkilerin olduğundan dolayı tercih edilmemektedir. Kojik asitten sonra tirosinaz enzimini en iyi %50 inhibe edebilen örnekler havlıcan ekstraktı katısı (MeOH), *C. vulgaris* katısı ve havlıcan ekstraktı katısı (EtOH) gelmektedir.

Krem formülasyonunda bulunan havlıcan ekstraktın IC50 değeri diğerlerine göre biraz daha düşük çıkmasının sebebi krem içersinde çözünürlüğü ile açıklanabilir. Krem formülasyonlarındaki diğer hammaddelerin tirozinaz inhibe edici özelliği olanlar seçilebilir. Ekstraksiyon işlemindeki çözücü değiştirilebilir. Kozmetik için gerekli olan

organik maddelerin bulunup onlar üzerinde çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu tezde amaçlanan hedef havlıcan ve *Chlorella vulgaris* ilerleyen zamanlarda kozmetik, gıda ve ilaç endüstrilerinde daha fazla yer bulmaları için özellikleri araştırılmıştır.

KAYNAKLAR

Abubakar, I. B., Malami, I., Yahaya, Y. ve Sule, S. M.(2018). A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Alpinia officinarum Hance. Journal of Ethnopharmacology, 224, 45–62. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.027

Adak, T. (2019). Kojik Asit Türevi Bileşiklerin Tasarımı, Sentezi ve Melanoma Hücresine Karşı Sitotoksisiteleri ile TirozinazİnhibisyonuEtkilerinin Değerlendirilmesi (Yüksek lisans tezi) Hacettepe Üniversitesi/Sağlık bilimleri enstitüsü/ Farmasötik Kimya/Ankara Erişim adresi: http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/8630/10214344.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Carballo, J., Barba, F.ve Lorenzo, J. (2018). Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (Ascophyllum nodosum, Fucus vesiculosus and Bifurcaria bifurcata) and Micro-Algae (Chlorella vulgaris and Spirulina platensis) Assisted by Ultrasound. Medicines, 5(2), 33. https://doi.org/10.3390/medicines5020033

Ahmed, E. M.(2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of Advanced Research, 6(2), 105–121. https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006

Akalın, G. O. (2011).Akalın, O. G. (2011). Jelatin Hidrojellerinin Sentezlenmesi, Şişme/ Bozunma Davranışlarının İncelenmesi ve Uygun İmmobilizeLipaz–Jelatin Hidrojel Sisteminin Oluşturulması (Yüksek lisans tezi). Gazi Üniversitesi/Fen bilimleri enstitüsü/Ankara. Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Alam, S., Algahtani, M. S., Ahmad, M. Z. ve Ahmad, J.(2020). Investigation utilizing the HLB concept for the development of moisturizing cream and lotion: In-vitro characterization and stability evaluation. Cosmetics, 7(2), 43. https://doi.org/10.3390/cosmetics7020043

An, N., Zou, Z. M., Tian, Z., Luo, X. Z., Yang, S. L. ve Xu, L. Z. (2008). Diarylheptanoids from the rhizomes of Alpinia officinarum and their anticancer activity. Fitoterapia, 79(1), 27–31. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.07.001

Astuti, I. Y., Yupitawati, A. ve Nurulita, N. A.(2021). Anti-aging activity of tetrahydrocurcumin, Centella asiatica extract, and its mixture. Advances in Traditional Medicine, 21(1), 57–63. https://doi.org/10.1007/s13596-020-00532-9

Ayusuk, S., Siripongvutikorn, S., Thummaratwasik, P. ve Usawakesmanee, W.(2009). Effect of heat treatment on antioxidant properties of tom-kha paste and herbs/spices used in tom-kha paste. Kasetsart Journal - Natural Science, 43(5), 305–312.

Baki, G. ve Alexander S. K. (2015). IntroductiontoCosmeticFormulationandTechnology. Erişim adresi: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=tM_0BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR15&dq= cosmetic+general+information&ots=raeN-

4aVhA&sig=ISizicQQz27_LvoBxMetS5FzfKg&redir_esc=y#v=onepage&q=cosmetic%20general%20information&f=false

Barrington, R., Williamson, G., Bennett, R. N., Davis, B. D., Brodbelt, J. S. ve Kroon, P. A.(2009). Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CaCo-2/TC7 cell model. Journal of Functional Foods, 1(1), 74–87. https://doi.org/10.1016/j.jff.2008.09.011

Ben-Amotz, A. ve Fishler, R. (1998). Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis β-carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel. Food Chemistry, 62(4), 515–520. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00196-9

Bronze-Uhle, E. S., Paulin, J. V., Piacenti-Silva, M., Battocchio, C., Rocco, M. L. M. ve Graeff, C. F. de O.(2016). Melanin synthesis under oxygen pressure. Polymer International, 65(11), 1339–1346. https://doi.org/10.1002/pi.5185

Cabanes, J., Chazarra, S., GarciaCarmona, F. (1994). Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slowbinding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 46(12), 982–985. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x

Carazo Fernández, A., Smutny, T., Hyrsová, L., Berka, K. ve Pavek, P.(2015). Chrysin, baicalein and galangin are indirect activators of the human constitutive androstane receptor (CAR). Toxicology Letters, 233(2), 68–77. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.013.

Cercamondi, C. I., Egli, I. M., Mitchikpe, E., Tossou, F., Hessou, J., Zeder, C., … Hurrell, R. F.(2013). Iron bioavailability from a lipid-based complementary food fortificant mixed with millet porridge can be optimized by adding phytase and ascorbic acid but not by using a mixture of ferrous sulfate and sodium iron EDTA. Journal of Nutrition, 143(8), 1233–1239. https://doi.org/10.3945/jn.113.175075

Chang, M. L. ve Chang, C. M. (2003). Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33(4), 617–626. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00343-1

Chen, F., Tan, Y. F., Li, H. L., Qin, Z. M., Cai, H. D., Lai, W. Y., … Zhang, J. Q.(2015). Differential systemic exposure to galangin after oral and intravenous administration to rats. Chemistry Central Journal, 9(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s13065-015-0092-5

Correa, M. S., Fetzer, D. L., Hamerski, F., Corazza, M. L., Scheer, A. P. Ve Ribani, R. H.(2021). Pressurized extraction of high-quality blackberry (Rubus spp. Xavante cultivar) seed oils. Journal of Supercritical Fluids, 169, 105101. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105101

Çağlar, M. Y. ve Demirci, M.(2017). Phenolic compounds in berry fruits and their importance in nutrition. European Journal of Science and Technology, 7(11), 18–26.

de Melo, R. G., de Andrade, A. F., Bezerra, R. P., Viana Marques, D. de A., da Silva, V. A., Paz, S. T., de Lima Filho, J. L., Porto, A. L. F.2019. Hydrogel-based Chlorella vulgaris extracts: a new topical formulation for wound healing treatment.

Journal of Applied Phycology, 31(6), 3653–3663. https://doi.org/10.1007/s10811-019-01837-2

Desiderio, C., Ossicini, L. ve Fanali, S. (2000). Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. Journal of Chromatography A, 887(1–2), 489–496. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01197-8

Ding, P., Yang, L., Feng, C. ve Xian, J.(2019). Research and application of Alpinia officinarum in medicinal field. Chinese Herbal Medicines, 11(2), 132–140. https://doi.org/10.1016/j.chmed.2019.04.003

Doğrusoy, Ş. (2018).Aljinat/KappaKerajinHidrojel Sistemlerinden TimololMaleatınSalımının İncelenmesi (Yüksek lisans tezi). Yıldız TekniikÜniversitesi/Fen bilimleri enstitüsü/Kimya mühendisliği/İstanbul. Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Dorgham, N. A., Hegazy, R. A., Sharobim, A. K. ve Dorgham, D. A.(2020). Efficacy and tolerability of chemical peeling as a single agent for melasma in dark-skinned patients: A systematic review and meta-analysis of comparative trials. Journal of Cosmetic Dermatology, 19(11), 2812–2819. https://doi.org/10.1111/jocd.13725

Ekmen, M. (2019).İzolösin Türevi Tetraamit Bileşiklerinin Jelleşme Özelliklerinin İncelenmesi. (Yüksek lisans tezi) Batman Üniversitesi/Fen bilimleri enstitüsü/Batman Erişim adresi: https://hdl.handle.net/20.500.12402/2334

Ermiş, S. (2007).Terbinafinin Yarı Katı İlaç Şekilleri Üzerinde Çalışmalar (Yüksek lisans tezi) Gazi üniversitesi/Sağlık bilimleri enstitüsü/Ankara. Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Fard, M. A. ve Shojaii, A. (2013). Efficacy of Iranian traditional medicine in the treatment of epilepsy. BioMed Research International, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/692751

Fleurentin, J. ve Pelt, J. M. (1982). Repertory of drugs and medicinal plants of Yemen. Journal of Ethnopharmacology, 6(1), 85–108. https://doi.org/10.1016/0378-8741(82)90073-3

Final Report of the Safety Assessment of Niacinamide and Niacin, (2005). International journal of toxicology, 24, 1–31. https://doi.org/10.1080/10915810500434183

Gao, J., Yang, H. ve Li, B.(2016). Investigating the Roles of Dissolved Organic Matter on Arsenic Mobilization and Speciation in Environmental Water. Clean - Soil, Air, Water, 44(7), 818–828. https://doi.org/10.1002/clen.201500610

Garcia Bartels, N., Lünnemann, L., Stroux, A., Kottner, J., Serrano, J. ve Blume-Peytavi, U.(2014). Effect of diaper cream and wet wipes on skin barrier properties in infants: A prospective randomized controlled trial. Pediatric Dermatology, 31(6), 683–691. https://doi.org/10.1111/pde.12370

Ghadishah, D. ve Gorchynski, J. (2002). Airway Compromise After Routine Alpha-Hydroxy Facial Peel Administration: The Journal of Emergency Medicine, Vol. 22(4), 353–355. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00343-1

Gouveia, L. ve Empis, J. (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in

microalgal extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 4(2), 227–233. https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00002-X

Güneş, M. E., Şahin, S., Demir, C., Borum, E. ve Tosunoğlu, A.(2016). Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities. Journal of Food Biochemistry, 41(3), 1–12. https://doi.org/10.1111/jfbc.12345

Güzel, Y., Güzelşemme, M. ve Miski, M. (2015). Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. Journal of Ethnopharmacology, 174, 118–152. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.042

Habashy, N. H., Abu Serie, M. M., Attia, W. E. ve Abdelgaleil, S. A. M.(2018). Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek Thymus vulgaris extracts and their possible synergism with Egyptian Chlorella vulgaris. Journal of Functional Foods, 40(December 2017), 317–328. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.022

Hamed, I. (2016). The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(6), 1104–1123. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227

Heo, M. Y., Sohn, S. J. ve Au, W. W.(2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 488(2), 135–150. https://doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00054-0

Huang, S. C., Lin, C. C., Huang, M. C. ve Wen, K. C. (2004). Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid, arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. Journal of Food and Drug Analysis, 12(1), 13–18. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2660

Hui, X., Wu, G., Han, D., Gong, X., Stipkovits, L., Wu, X., … Brennan, C. S.(2021). Bioactive compounds from blueberry and blackcurrant powder alter the physicochemical and hypoglycaemic properties of oat bran paste. Lwt, 143(September 2020), 111167. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111167

Imamura, Y., Migita, T., Uriu, Y., Otagiri, M. ve Okawara, T.(2000). Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase. Journal of Biochemistry, 127(4), 653–658. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022653

Indrayah, A. K., Agrawal, P., Rathi, A. K., Shatru, A., Agrawal, N. K. ve Tyagi, D. K.(2009). Nutritive value of some indigenous plant rhizomes resembling Ginger. Natural Product Radiance, 8(5), 507–513.

Jamila, F. ve Mostafa, E. (2014). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. Journal of Ethnopharmacology, 154(1), 76–87. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.016

Janik-Hazuka, M., Szafraniec-Szczęsny, J., Kamiński, K., Odrobińska, J. ve Zapotoczny, S.(2020). Uptake and in vitro anticancer activity of oleic acid delivered in nanocapsules stabilized by amphiphilic derivatives of hyaluronic acid and chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, 164, 2000–

2009. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.288

Joseph, P., Klein-Szanto, A. J. P. ve Jaiswal, A. K. (1998). Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and in vivo tumorigenesis. British Journal of Cancer, 78(3), 312–320. https://doi.org/10.1038/bjc.1998.492

Juncan, A. M., Rus, L. L., Gligor, F. G. ve Morgovan, C.(2019). Determination of alpha-tocopherol acetate in an anti-aging cosmetic cream by gas chromatography. Revista de Chimie, 70(2), 555–559. https://doi.org/10.37358/rc.19.2.6954

Kabaş , Z. (2006).. İndometasinin, Kalsiyum Klorür İle Çapraz Bağlanmış Sodyum Aljinat ve Poli(vinil alkol) / Sodyum aljinat Mikrokürelerden Kontrollü Salımı. (Yüksek lisans tezi) Gazi üniversitesi/Fen bilimleri enstitüsü/Ankara Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Karkar, B., Şahin, S. ve Güneş, M. E. (2020). Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. Journal of Apicultural Research, 0(0), 1–10. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844462

Kim, T., Kim, H. J., Cho, S. K., Kang, W. Y., Baek, H., Jeon, H. Y., … Kim, D.(2011). Nelumbo nucifera extracts as whitening and anti-wrinkle cosmetic agent. Korean Journal of Chemical Engineering, 28(2), 424–427. https://doi.org/10.1007/s11814-010-0357-6

Koluman, N. M. A. ve Süzgeç-Selçuk, S. (2016). Eczaneler'de Fitokozmetikler. Marmara Pharmaceutical Journal, 20(1), 7–20. https://doi.org/10.12991/mpj.201620774965

Köse, L. P., Gülçin, I., Gören, A. C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A. L., Gorinstein, S.(2015). LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (Alpinia officinarum Hance) rhizomes. Industrial Crops and Products, 74, 712–721. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.034

Law, F., Evans, L. A., Knudtson, S., Nus,J., Scholl, S., K. ve Sluka, K. A.(2008). Massage Reduces Pain Perception and Hyperalgesia in Experimental Muscle Pain: A Randomized, Controlled Trial. Journal of Pain, 9(8), 714–721. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.03.009

Lim, T. K. (2015). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants (Vol. 10). https://doi.org/10.1007/978-94-017-7276-1

Lin, C. H., Wu, H. L. ve Huang, Y. L. (2005). Microdialysis sampling coupled to on-line high-performance liquid chromatography for determination of arbutin in whitening cosmetics. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 829(1–2), 149–152. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.008

Lin, L. Y., Peng, C. C., Yeh, X. Y., Huang, B. Y., Wang, H. E., Chen, K. C. ve Peng, R. Y.(2015). Antihyperlipidemic bioactivity of Alpinia officinarum (Hance) Farw Zingiberaceae can be attributed to the coexistance of curcumin, polyphenolics, dietary fibers and phytosterols. Food and Function, 6(5), 1600–1610. https://doi.org/10.1039/c4fo00901k

Ly, T. N., Yamauchi, R., Shimoyamada, M. ve Kato, K.(2002). Isolation and structural elucidation of some glycosides from the rhizomes of smaller galanga (Alpinia officinarum Hance). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(17), 4919–4924. https://doi.org/10.1021/jf025529p

Ly, T. N., Shimoyamada, M., Kato, K. ve Yamauchi, R.(2003). Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (Alpinia officinarum Hance). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(17), 4924–4929. https://doi.org/10.1021/jf034295m

Mak, K. K., Tan, J. J., Marappan, P., Balijepalli, M. K., Choudhury, H., Ramamurthy, S. ve Pichika, M. R.(2018). Galangin's potential as a functional food ingredient. Journal of Functional Foods, 46(March), 490–503. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.054

Mayachiew, P. ve Devahastin, S.(2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. LWT - Food Science and Technology, 41(7), 1153–1159. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.019

May, N. ve Guenther, E.(2020). Shared benefit by Material Flow Cost Accounting in the food supply chain – The case of berry pomace as upcycled by-product of a black currant juice production. Journal of Cleaner Production, 245(1), 118946. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118946

Metin, C. ve Baygar, T. (2018). Denizel Kaynaklardan Elde Edilen Biyoaktif Maddeler ve Kozmetik Alanında Kullanımı. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 14(4), 339–350. https://doi.org/10.22392/egirdir.399363

Nakagawa, M., Kawai, K. ve Kawai, K. (1995). Contact allergy to kojic acid in skin care products. Contact Dermatitis, , 9–13. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00832.x

Nasir, N. T. B. M, Sahin, S. ve Çakmak, Z. E. ve Çakmak, T.(2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction via multiresponse surface for high antioxidant recovery from Chlorella vulgaris (Chlorophyta). Phycologia, 56(5), 561–569. https://doi.org/10.2216/16-132.1

Nordqvist, C. B., ve Mehr K. (1977). Allergic Contact Dermatitis to Retinoic Acid. Concat Dermatitis, 3(1), 55-56. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1977.tb03594.x

Oh, Y. S., Shin, S. Y., Kim, S., Lee, K. H., Shin, J. C. ve Park, K. M.(2020). Comparison of antiaging, anti-melanogenesis effects, and active components of Raspberry (Rubus occidentalis L.) extracts according to maturity. Journal of Food Biochemistry, 44(11), 1–10. https://doi.org/10.1111/jfbc.13464

Otake, Y., Hsieh, F. ve Walle, T.(2002). Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. Drug Metabolism and Disposition, 30(5), 576–581. https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.576

Pegoraro, N. S., Barbieri, A. V., Camponogara, C., Mattiazzi, J., Brum, E. S., Marchiori, M. C. L., … Cruz, L.(2017). Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and

vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 150, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013

Pei, S. J. (1985). Preliminary study of ethnobotany in xishuang banna, people's republic of china. Journal of Ethnopharmacology, 13(2), 121–137. https://doi.org/10.1016/0378-8741(85)90001-7

Petrangolini, G., Ronchi, M., Frattini, E., De Combarieu, E., Allegrini, P. ve Riva, A.(2019). A New Food-grade Coenzyme Q10 Formulation Improves Bioavailability: Single and Repeated Pharmacokinetic Studies in Healthy Volunteers. Current Drug Delivery, 16(8), 759–767. https://doi.org/10.2174/1567201816666190902123147

Piamphongsant, T. (1998). Treatment of melasma: A review with personal experience. International Journal of Dermatology, 37(12), 897–903. https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.1998.00585.x

Rana, V. S., Verdeguer, M. ve Blazquez, M. A.(2010). GC and GC/MS Analysis of the Volatile Constituents of the Oils of Alpinia galanga (L.) Willd and A. Officinarum Hance Rhizomes. Journal of Essential Oil Research, 22(6), 521–524. https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700388

Rao, A. V. ve Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. Pharmacological Research, 55(3), 207–216. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012

Re. R., Pellegrini, N., Proteggente. A., Pannala, A., Yang, M. ve Evans, R. C. (1999). Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay, 26, 1231-1237. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Rezaei, A., Farzadfard, A., Amirahmadi, A., Alemi, M. ve Khademi, M. (2015). Diabetes mellitus and its management with medicinal plants: A perspective based on Iranian research. Journal of Ethnopharmacology, 175, 567–616. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.010

Salgado, B., Paramo, R. ve Sumano, H. (2007). Successful treatment of canine open cervix-pyometra with Yun-Nan-Pai-Yao, a Chinese herbal preparation. Veterinary Research Communications, 31(4), 405–412. https://doi.org/10.1007/s11259-006-3438-6

Salvador, A. ve Chisvert, A. (2007). Analysis of Cosmetic Products. Erişim adresi: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=IYf8FDXlD5oC&oi=fnd&pg=PP1&dq=coscosmetic+general+information&ots=wlJckrepK&sig=Vxk4VJeKDjkBvZDOK9XRqtVFbPQ&redir_esc=y#v=onepage&q=cosmetic%20general%20information&f=false

Sawamura, R., Shimizu, T., Sun, Y., Yasukawa, K., Miura, M., Toriyama, M., … Kurokawa, M.(2010). In vitro and in vivo anti-influenza virus activity of diarylheptanoids isolated from Alpinia officinarum. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 21(1), 33–41. https://doi.org/10.3851/IMP1676

Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W. ve Kurokawa, M.(2010). Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus in vitro.

Journal of Natural Medicines, 64(1), 117–120. https://doi.org/10.1007/s11418-009-0372-2

Schiavon, D., Martini D. N., Brocco, G., Santos, J. S., Anzolin, A. P., Grazziotin, L., … Bertol, D. C. (2019). Multifunctional Cosmetic Containing Blueberry and Tinosorb M-Loaded Microparticles Improves Sunscreen Performance, 9(2), 241-248. doi: 10.15171/apb.2019.027

Shahidi, F. ve Ambigaipalan, P.(2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. Journal of Functional Foods, 18, 820–897. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018

Shapiro, Y. E.(2011). Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. Progress in Polymer Science (Oxford), 36(9), 1184–1253. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.04.002

Sharma, H. K., Chhangte, L. ve Dolui, A. K. (2001). Traditional medicinal plants in Mizoram, India. Fitoterapia, 72(2), 146–161. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00278-1

Shih, Y. (2001). Simultaneous Determination of Magnesium L-Ascorbyl-2-Phosphate and Kojic Acid in Cosmetic Bleaching Products by Using a Microbore Column and Ion-Pair Liquid Chromatography. Journal of AOAC International 84(4), 1045-1049. https://doi.org/10.1093/jaoac/84.4.1045

Shih, Y. ve Zen, J. M. (1999). Determination of magnesium ascorbyl phosphate in cosmetic bleaching products using a disposable screen-printed carbon electrode. Journal of the Chinese Chemical Society, 46(6), 865–870. https://doi.org/10.1002/jccs.199900117

Shih, Y. ve Zen, J. M. (2000). An Electrochemical Sensor Based On a Clay-Coated Screen-Printed Electrode For The Determination Of Arbutin.Analytica Chimica Acta, 412(1-2), 63-68. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00725-X

Shin, D., Kinoshita, K., Koyama, K. ve Takahashi, K.(2002). Antiemetic principles of Alpinia officinarum. Journal of Natural Products, 65(9), 1315–1318. https://doi.org/10.1021/np020099i

Skrede, G., Wrolstad, R. E. ve Durst, R. W.(2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (Vaccinium corymbosum L.). Journal of Food Science, 65(2), 357–364. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007.x

Sop, E. S. (2013). Doku Genişletme Amaçlı Hidrojel Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Kinetiği (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi/Kimya mühendisliği/Ankara Erişim adresi: http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/handle/11655/2808

Soto, M. L., Falqué, E. ve Domínguez, H.(2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. Cosmetics, 2(3), 259–276. https://doi.org/10.3390/cosmetics2030259

Sottofattori, E., Anzaldi, M., Balbi, A. ve Tonello, G. (1998). Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream. Journal of

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18(1–2), 213–217. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00173-3

Srividya, A. R., Dhanabal, S. P., Misra, V. K. ve Suja, G.(2010). Antioxidant and antimicrobial activity of Alpinia officinarum. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 72(1), 145–148. https://doi.org/10.4103/0250-474X.62233

Sungur A. S., Şahne, S. B., Yeğenoğlu, S.2018. Kozmetik ürünleri tarihçesi, ürün tanitimlarinin yasal durumu ve tüketici davranişi açisindan değerlendirilmesi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi, 8(3), 191–197. https://doi.org/10.31020/mutftd.432259

Şahin, S., Işik, E., Aybastier, Ö. ve Demir, C. (2012). Orthogonal signal correction-based prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms. Journal of Chemometrics, 26(7), 390–399. https://doi.org/10.1002/cem.2450

Şahin, S., Nasir, N. T. B. M., Erken, I., Çakmak, Z. E. ve Çakmak, T.(2019). Antioxidant composite films with chitosan and carotenoid extract from Chlorella vulgaris: Optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids and surface characterization of chitosan films. Materials Research Express, 6(9). https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab2def

Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Barreiro, M. F., … Ferreira, I. C. F. R.(2016). Development of Mushroom-Based cosmeceutical formulations with Anti-Inflammatory, Anti-Tyrosinase, antioxidant, and antibacterial properties. Molecules, 21(10), 1–12. https://doi.org/10.3390/molecules21101372

Tocco, G., Fais, A., Meli, G., Begala, M., Podda, G., Fadda, M. B., … Berretta, S.(2009). PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol-coumarin derivatives: Preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 19(1), 36–39. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.020

Tolomeo, M., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Pipitone, R. M., Dusonchet, L., Meli, M., … Simoni, D.(2008). Galangin increases the cytotoxic activity of imatinib mesylate in imatinib-sensitive and imatinib-resistant Bcr-Abl expressing leukemia cells. Cancer Letters, 265(2), 289–297. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.025

Torbati, T. V. ve Javanbakht, V.(2020). Fabrication of TiO_2/Zn_2TiO_4/Ag nanocomposite for synergic effects of UV radiation protection and antibacterial activity in sunscreen. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 187(November 2019), 110652. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110652

Torreao, P., Phua, E., Clark, R., Fernandes, E., Pontes, T., Fonseca, A. P., … Kerob, D.(2021). Evaluation of the efficacy and tolerance of a cosmetic mask containing 89% of vichy volcanic mineralizing water and hyaluronic acid after facial laser procedures. Journal of Cosmetic Dermatology, (December 2020), 1–7. https://doi.org/10.1111/jocd.13972

Ulusoy, A. ve Dikmen, N.(2020). Hidrojellerin Tıpta Uygulamaları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 29(2), 129–137. https://doi.org/10.17827/aktd.603432

Yeum, K. J. ve Russell, R. M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. Annual Review of Nutrition, 22, 483–504. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102834

Yılmaz, A. (2019). Chlorella protothecoides Mikroalg Yağının Karakterizasyonu, Biyoaktif Özellikleri ve Antifungal Etkinliği. Akademik Gıda, 17(2), 217–225. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.613575

Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P. ve Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. Bioresource Technology, 184, 355–362. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001

Waniek, S., Di Giuseppe, R., Esatbeyoglu, T., Plachta-Danielzik, S., Ratjen, I., Jacobs, G., … Lieb, W.(2018). Vitamin E (α-and γ-tocopherol) levels in the community: Distribution, clinical and biochemical correlates, and association with dietary patterns. Nutrients, 10(1). https://doi.org/10.3390/nu10010003

Wu, T., Yang, L., Guo, X., Zhang, M., Liu, R. ve Sui, W.(2018). Raspberry anthocyanin consumption prevents diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and modulating hepatic lipid metabolism. Food and Function, 9(4), 2112–2120. https://doi.org/10.1039/c7fo02061a

Zerbinati, N., Sommatis, S., Maccario, C., Di Francesco, S., Capillo, M. C., Rauso, R., … Mocchi, R.(2021). The anti-ageing and whitening potential of a cosmetic serum containing 3-o-ethyl-l-ascorbic acid. Life, 11(5). https://doi.org/10.3390/life11050406

Zhang, L., Pan, C., Ou, Z., Liang, X., Shi, Y., Chi, L., … Xiang, H.(2020). Chemical profiling and bioactivity of essential oils from Alpinia officinarum Hance from ten localities in China. Industrial Crops and Products, 153(May), 112583. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112583

Zhang, M. Q. ve Rees, D. C. (1999). A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 9(12), 1697–1717. https://doi.org/10.1517/13543776.9.12.1697

Zhang, W., Tang, B., Huang, Q. ve Hua, Z.(2013). Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. Journal of Cellular Biochemistry, 114(1), 152–161. https://doi.org/10.1002/jcb.24312

Zhu, H. ve Kannan, K.(2020). Parabens in stretch mark creams: A source of exposure in pregnant and lactating women. Science of the Total Environment, 744, 141016. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141016