T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYAZ DUT EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

TUĞÇE KÜÇÜKYILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. YEŞİM YEŞİLOĞLU

EDİRNE-2017

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Mesut KAÇAN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir yüksek lisans tezi olarak oy birliği/çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU	
Prof. Dr.Yüksel BAYRAK	
Yrd. Doç. Dr. Cemile ÖZCAN	

09/05/2017

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

26/05/2017

Tuğçe KÜÇÜKYILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

BEYAZ DUT EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin insan vücuduna zarar verici etkilerini engelleyen bileşikler olması günümüz araştırmacılarının da büyük ilgisini çekmektedir. Reaktif oksijen türleri, DNA ve RNA gibi biyomoleküllere saldırarak birçok hastalıklara ve doku zedelenmelerine neden olmaktadır. Serbest radikal gidericilerin günümüzde sık karşılaşılan hastalığı olan kanserin de önlenmesinde önemli göreve sahip olduğu bilinmektedir. Bunların dışında gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde doğal antioksidanlara büyük ihtiyaç duyulması bitkisel kaynaklı olan bileşik ekstraktlarının antioksidan etkilerinin belirlenmesine olan ilgiyi daha da arttırmaktadır. Bunlar aynı zamanda doğal antioksidanlar arasında da yer almaktadır.

Bu çalışmada antioksidan kapasitesinin incelenmesi için; beyaz dut meyve ve yaprak gölgede kurutularak ayrı ayrı su, metanol ve aseton ekstraktları hazırlanmıştır. Çalışmalar sonucunda en iyi serbest radikal giderme aktivitesi ise aseton ekstraktlarında gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda; beyaz dut meyve ve yapraklarının serbest radikal giderici özelliği bulunmuştur.

Yıl : 2017

Sayfa Sayısı : 66

Anahtar Kelimeler :antioksidan aktivite, DPPH, fenolik madde.

Master Thesis

Trakya University Institute of Natural Sciences
Chemistry

ABSTRACT

Antioxidants are of great interest to contemporary researchers as reactive oxygen species are compounds that inhibit the harm effects of the human body. Reactive oxygen species are attacked by biomolecules like DNA and RNA, being reason cell and tissue injuries involving degenerative diseases. The most important disease of free radical scavengers today also as important factor in preventing cancer. Especially to allow for the determination of the antioxidant effects of plant extracts of the greatest need for natural antioxidants in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

In this study, for examining the antioxidant capacity; White mulberry fruit and leaf extracts were dried in the shade and separately water and acetone extracts were prepared. Acetone was observed on the extracoat. Directing these results; It is known that white mulberry fruits and leaves can be produced and used in a good way with an antioxidant.

Year : 2017
Number of Pages : 66
Keywords : antioxidant activity, White mulberry, phenolic

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında yardımını ve bilgilerini esirgemeyen, yol göstericim olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU' na teşekkürü borç bilirim.

Özellikle antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN' a çok teşekkür ederim.

Ayrıca deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Burcu Mangan, Ali Demirkıran ve Gökhan Günduğan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak da kuşkusuz, hem maddi hem manevi desteklerini hiçbir konuda esirgememiş olan ve beni bugünlere getiren canım annem Yeşim Evciler'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Mayıs-2017

Tuğçe KÜÇÜKYILDIRIM

İÇİNDEKİLER

ÖZET I

ABSTRACT II

TEŞEKKÜR III

İÇİNDEKİLER IV

KISALTMALAR VIII

TABLOLAR DİZİNİ IX

ŞEKİLLER DİZİNİ X

1. GİRİŞ 1

2. BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER 2

2.1.Serbest Radikaller 2

2.1. 1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) 5

2.1.1.1.O_2^- (Süperoksit) radikali 5

2.1.1.2.H_2O_2 (Hidrojen peroksit) 6

2.1.1.3.OH^- (Hidroksil) radikali 6

2.1.1.4.Singlet Oksijen ($^1O_2$): 6

2.1.1.5.HOCl (Hipokloröz asit) 6

2.1.2. Hücredeki ROT Kaynakları 7

2.1.2.1. Biyolojik kaynaklar 7

2.1.2.2. İnstraselluer kaynaklar (Hücreiçi) 8

2.1.3. Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri 9

2.1.3.1. Lipitlere etkileri 9

2.1.3.2. Proteinlere etkileri 10

2.1.3.3. Nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri: 10

2.1.3.4. Karbonhidratlara etkileri 11

2.2. Antioksidanlar 11

2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması 12

2.2.1.1. ENZİMLER 12

2.2.1.2. Yağda ve suda çözünenler: 14

2.2.1.3. Metal İyonlarını bağlayıcı proteinler: 19

2.2.1.4. Eksojen antioksidanlar 19

2.3.Gıdalardaki Antioksidanlar 19

2.3.1. Doğal antioksidanlar 19

2.3.2. Sentetik antioksidanlar 19

2.4. Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri 20

2.4.1. HAT temelli metodlar 20

2.4.1.1. ORAC: Oksijen Radikali Absorplama Aktivitesi 20

2.4.1.2. TRAP: Toplam Radikal Kapanı Antioksidan Parametresi 21

2.4.1.3. TOCS: Toplam Radikal Yakalayıcı Aktivitesi 21

2.4.1.4. Krosin veya Beta Karoten Ağartma Metodu 21

2.4.1.5. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi 22

2.4.2. ET temelli metodlar 22

2.4.2.1. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi 22

2.4.2.2. DPPH Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi 23

2.4.2.3. CUPRAC Yöntemi 24

2.4.2.4. FRAP Yöntemi 24

2.4.2.5. FCR ile Toplam Fenolik Yöntemi 25

2.5. Çalışmada Kullanılan Meyve 25

3. BÖLÜM 27

MATERYAL VE YÖNTEM 27

3.1. Materyal 27

3.1.1. Meyve Örneği 27

3.1.2. Kimyasallar ve Cihazlar 28

3.2. Yöntem 29

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı 30

3.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini 30

3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini 31

3.2.4. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini 31

3.2.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini 32

3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini 32

3.2.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini 33

3.2.8. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi 33

3.2.9. ABTS Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini 33

3.2.10. Değerlendirme 34

4 BÖLÜM 35

BULGULAR VE TARTIŞMA 35

4.1. Toplam Fenolik Madde Analizi 35

4.2. Toplam Flavonoid Analizi: 38

4.3. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi 41

4.4. ABTS $^{+}$ Radikal Katyon Yakalama Aktivitesi 45

4.5. Linoleik Asit Emülsiyon Sistemi veya Demir tiyosiyanat Metodu 46

4.6. İndirgeme Gücü Metodu 49

4.7. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini 50

4.8. Süperoksit radikali giderme 52

5.BÖLÜM 55

SONUÇLAR 55

5.1. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini : 55

5.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini; 56

5.3. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe^{+3}) İndirgeme Kapasitesinin Tayini: 56

5.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini: 57

5.5. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini: 57

5.6. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini: 58

5.7. $ABTS^{+}$ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini: 58

5.8. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu: 58

6.BÖLÜM 60

KAYNAKLAR 60

KISALTMALAR

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	Demir (III)iyonu indirgeme gücü
FTC	Ferrik tiyosiyanat
GAE	Gallik asit eşdeğeri
G-SH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH-Red	Glutatyon redüktaz
GST	Glutatyon-S-transferaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit
NADH	Nikotinamidadenindinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolyum
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi
PG	Propil gallat
PMS	Fenazin metasülfat
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	t-Bütil hidroksikinon
TEAC	Trolox ekivalenti antioksidan kapasite
TPC	Toplam fenolik madde

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller 4

Tablo 2.2. Flavonollar ve flavonların kimyasal yapıları 17

Tablo 4.1.Örneklerin gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı 36

Tablo 4.2.Örneklerin pirogallol cinsinden toplam fenolik madde miktarı 37

Tablo 4.3.Örneklerin epikateşin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı 39

Tablo 4.4.Örneklerin gallik asit cinsinden toplam flavonoid madde miktarı 40

Tablo 4.5.Örnek ekstraktlarının EC50 değeri 42

Tablo 4.6.Örneklerin çeşitli zamanlardaki linoleik asit peroksidasyon inhibisyon yüzdesi 47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Solunum patlamada oluşan ROT'lar 7
Şekil 2.2. Radikallerin hücresel hedefleri 9
Şekil 2.3. ABTS Yöntemi 23
Şekil 2.4. DPPH radikali ve antioksidan (AO-H) tarafından indirgenmesi 24
Şekil 2.5. CUPRAC reaksiyonu ve kromoforu 25
Şekil 2.6. [Fe(II)$(TPTZ)_2$] oluşumu 25
Şekil 3.1. Rotary evaporatör ile çözücü uzaklaştırma işlemi 30
Şekil 4.1. Gallik asit standart grafiği 35
Şekil 4.2. Pirogallol standart grafiği 36
Şekil 4.3. Örneklerin gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı 38
Şekil 4.4. Örneklerin pirogallol cinsinden toplam fenolik madde miktarı 38
Şekil 4.5. Epikateşin kalibrasyon eğrisi 39
Şekil 4.6. Gallik asit standart kalibrasyon eğrisi 40
Şekil 4.7. Örneklerin epikateşin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı 41
Şekil 4.8. Örneklerin gallik asit cinsinden toplam flavonoid madde miktarı 41
Şekil 4.9. Yaprak ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktiviteleri 43
Şekil 4.10. Dut ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktiviteleri 44
Şekil 4.11. Yaprak ekstraktlarının ABTS radikali giderme etkileri 45
Şekil 4.12. Dut ekstraktlarının ABTS radikali giderme etkileri 46
Şekil 4.13. Yaprak ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyon inhibisyonunun grafiksel olarak gösterimi 48
Şekil 4.14. Dut ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyon inhibisyonunun grafiksel olarak gösterimi 48
Şekil 4.15. Yaprak ekstraktlarının indirgenme kapasitesi 49
Şekil 4.16. Dut ekstraktlarının indirgenme kapasitesi 50
Şekil 4.17. Yaprak ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi 51
Şekil 4.18. Dut ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi 52
Şekil 4.19. Yaprak ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi 53
Şekil 4.20. Dut ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi 54

1. GİRİŞ

Geçmiş yıllardan bu zamana insanlar daha iyi bir yaşam sürdürmek amacıyla her alanda kendini geliştirmiş ve bugün yüksek bir seviyeye gelmiştir. Sürekli artan yaşam kalitesiyle birlikte daha uzun ve sağlıklı yaşayabilme isteği bilim adamlarının çalışma konuları arasında yerini almıştır. Bu konular; hastalıkların önlenmesi ve yaşlanma süresinin ertelenmesi olarak belirlenmiştir. Vücudumuzdaki savunma sistemlerinin belli bir noktadan sonra yetersiz kaldığı düşüncesi insanları antioksidan maddelere yöneltmiştir. Antioksidan maddelerin keşfedilmesinde meyve ve sebzeler daha çok ön plana çıkmış ve etkisi gözlenen meyvelerin içerisindeki maddeler izole edilmiştir. Çalışmalar devamlı ilerleme kaydetmiş ve zamanla meyvelerin antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı geniş bir grup haline gelmiştir.

Günümüzde beyaz dut meyvesinin taze olarak tüketiminin yanısıra, işlenmiş olarak yer alan ürünlerinin de besleyici özelliği olduğu bilinmektedir. Bunların antioksidan aktiviteleri ise; içerdikleri fenolik bileşiklerden ve flavonoidlerden kaynaklamaktadır.[1] 1976 yılında Kuhnau isimli bir bilim adamının yaptığı çalışmalarda flavonoidlerin; enfeksiyon giderici, alerji önleyici, virüslere karşı etkili, yaşlanmayı bir miktar geciktirici ve kanser hücrelerinin oluşumunu önleyici özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Doğal antioksidanların üretilmesinin sonucunda sağlanacak en büyük yarar oksidatif stresin var olan etkisinin azaltılmasıdır.

Bu çalışmanın amacı mevsiminde toplanan beyaz dut meyve ve yaprak ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesidir.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller:

Radikallerin hemen hemen hepsi elektron kaybettiklerinde ‘yükseltgenme’, elektron kazanıldıklarında ise ‘indirgenme’ olarak isimlendirilmekte olup bir reaksiyonda, bir reaktantın kaybettiği elektronun yerini mutlaka bir diğer reaktantın elektronu doldurmaktadır. Bu nedenle elektronun yörüngeler arası geçişlerinin veya aktarımının söz konusu olduğu, olaylarının tamamına ‘yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları’ veya ‘redoks reaksiyonları’ diye bahsedilmektedir.

Aralarında bulunan kovalent bağlarındaki elektron yörüngelerindeki elektronların yerlerinin değişmesiyle de bu tepkimeleri meydana getirmektedir. Bir oksidasyon-redüksiyon reaksiyonundaki elektron alıcısının elektrofilik özelliği sayesinde bir diğer molekülden elektron alarak kendi radikallerini oluşturmaktadır. Bileşiğin bir ya da daha fazla ortaklaşmamış elektronun varolan kimyasal türlere genellikle serbest radikaller veya radikaller diye isimlendirilmektedir.[2]

Radikaller, aslında yüksek enerjiye sahip ve kararsız özellikleri var olan tepkimeler esnasında oluşan ara ürünler olarak bilinmektedir. Ayrıca OH, fotokimyasal tepkime sonucunda, atmosferde az miktarda oluşmakta ve serbest radikaller üzerinde etkilidirler.

Serbest Radikaller;

- Endojen Kaynaklı Etmenler: İyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliğine neden olan sigara dumanı gibi çevresel faktörler,
- Ekzojen Kaynaklı Etmenler: Vücudumuza bağımlılık yapan ürün olarak bulunan alkol ve uyuşturucular

Önemli bir miktar ve çeşitlilikteki radikaller hücresel koşullar sağlandığında aşağıdaki mekanizmalar sayesinde radikallerini oluşturmaktadır.[3]

*Kovalent bağların homolitik kırılmasıyla: 700^0C gibi yüksek sıcaklıklar ile birlikte yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar kimyasal bağların birbirinden uzaklaşmasına yani ayrılmasına-kopmasına neden olmaktadır. İki elektronun her biri ayrılan bağın üzerinde durduğunda homolitik kırılma meydana gelmekte ve bu durumda eşleşmemiş elektronlar ayrı ayrı atomlar üzerinde bulunmaktadır. Heterolitik kırılması durumunda ise, zıt yüklü son derece reaktif özelliği varolan iyon çifleri oluşmaktadır.

*Molekülün elektron kaybetmesiyle: Radikal olmayan bir molekülün elektron kaybı esnasında son yörüngesinde bulunan elektronu eşleşmemişse, o halde radikal formu oluşmaktadır.

Süperoksitler; canlılarda birçok enzimatik ve/veya enzimatik olmayan tepkimelerle üretilmekte ve bunların radikallerinin oluşumundaki artış, oksijenin ve diğer radikal türlerinin oluşumu için başlangıç aşaması olarak görülmektedir.

Canlılar yaşamlarını devam ettirirken gerçekleşen tüm kimyasal tepkimeler sonucunda ortamda bulunan oksijen sayesine bağlı olarak çeşitli radikaller üretilebilmektedir.[4] Vücudumuzda çok fazla farklı tür radikal oluştuğu bilinirken bunların arasında üstünlük bakımından en önemlisi; süperoksit, H_2O_2, nitrik oksit ve hidroksil radikalidir.

İki temel radikal olan süperoksit ve nitrik oksit, yüksek derişimlerde enzimatik tepkimeler yoluyla oluşmaktadır. Buna ilaveten; kritik radikallerle birlikte radikal olmayan reaktif türleri de oluşturmaktadır.

Süperoksit ve nitrik oksit temel olan iki radikallerdendir ve bu radikaller önemli derişimlerde, sürekli olarak enzimatik tepkimelerde üretilmektedir. Süperoksit ve nitrik oksit temel radikalleri, kritik radikallerle birlikte radikal olmayan reaktif türlerin bir araya gelmesini sağlamaktadır.

Tablo 2.1 Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller

Etkilenen Bileşik	Sonuçlar
Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler	a)Protein denaturasyonu b)Çapraz bağlanma c)Enzim inhibisyonu d)Organ ve hücre geçirgenliğinde değişmeler
Nükleik asit bazları	a)Hücre gelişiminde değişmeler b)Mutasyon
Karbohidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipitler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	a)Nikotinamit ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma b)Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α-tokoferol ve β-karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	a)Denaturasyon b)Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	a)Baz modifikasyonları b)Zincirde kırılmalar
Hyaluronik asit	Synovial sıvının viskozitesinde değişim

Mekanizmalar sırasında oluşan oksijen radikalleri ile biyolojik fonksiyonlarında ürün olarak meydana gelen nitrik oksit, diğer ürünlere göre az miktarlarda oluşmaktadır. Düşük derişimlerdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan tepkimeleri tarafından aktivite özelliklerini yitirmekte, yani inaktive edilerek özellikle toksik etkilerini kaybetmelerine sebep olmaktadır. Nitrit oksit, oksijen radikallerin hepsi ile reaksiyona girerek kendisinden daha reaktif ürünlerini oluşturmakta yani her iki radikal bileşik grubunun oluşumu birbiriyle paralel şekilde yeni bir ürünle gerçekleşmektedir.

Bu oluşum neticesinde yeni ürünlerin bir kısmı kullanılmakta ve kalan kısım ise, istenilmeyen oksidatif strese neden olmaktadır. ROT'ların üretilmesiyle reaktif ürünleri zehirsiz hale getirilmesi veya meydana gelen hasarın onarılma yeteneğine sahip olması

gibi özellikleri bünyesinde barındırdığı yapılan çalışmalar neticesinde de bilinmektedir. Dokulardaki redoks tepkimeleri sırasındaki bazı bozukluklar, ortamdaki serbest radikallerle birleşerek toksik etkileri oluşturmaktadır.

İnsanlar üzerinde yapılan deneysel araştırmalarda görülen, Parkinson hastalığı ve kronik yorgunluk sendromu gibi hastalıkların esas kaynağı oksidatif stres olduğu kanıtsanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin bilinen faydası ise, kısa zamanda gerçekleşen 'mitohormesis' adlı bir işlemin harekete geçmesiyle yaşlanmayı engellemesi, mümkün olmasa da geciktirebilmesidir.[5]

2.1. 1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT):

ROT, hem kolaylıkla kısa bir zaman içerisinde radikallere çevrilebilen (HOCI, HOBr, $ONOO^-$, O_2, H_2O_2) hem de oksijen radikallerini bünyesinde barındıran okside edici ajan olarak bilinen bileşiklere özel ortak bir isim olarak kullanılmaktadır. Oksijen radikallerinin hepsi reaktif oksijen türlerden sayılırken, reaktif oksijen türlerinin hepsi oksijen radikali içerisinde yer almamaktadır. Bunlar sırasıyla şunlardır:

2.1.1.1. O_2^- (Süperoksit) radikali:

Moleküler oksijenin (O_2) son yörüngesinde iki adet elektron eşleşmemiş halde bulunurken farklı yörüngelerde bulunduklarında ve spinleri aynı hizada olduğunda enerjileri minimum seviyededir. Son yörüngelerde bulunan eşleşmemiş elektronlar yanlarına birer adet daha elektron almaları sonucunda süperoksit radikali oluşmaktadır.[6] Oksijenli solunum yapan canlıların çoğunda bu olay gerçekleşirken elektron transport zinciri de bu olayın esas kaynağı olarak görülmektedir.

Serbest radikal olan süperoksit anyonu reaktif özellik göstermemekte ve hücrelerdeki lipit molekülünün membranlarının seçici geçirgenlik özelliğinin giderek azalması üretilen serbest radikalin bir miktar birikmesine neden olmaktadır.

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^-$$

2.1.1.2. H_2O_2 (Hidrojen peroksit):

O_2'nin çevresindekilerden iki adet elektron alarak meydana gelen peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi ya da süper oksidin etrafındaki moleküllerden bir adet elektronun eksilmesi sonucunda oluşmaktadır.

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

Yukarıda gösterilen reaksiyon, radikal olmayan ürünlerden meydana geldiğinden uygun şartların oluşması için, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi kullanılarak katalizlenmekte ve bu şekilde tepkime hızlandırılmaktadır.

2.1.1.3. OH^- (Hidroksil) radikali:

OH^- (Hidroksil) radikali, ileri derece de reaktif bir oksidan radikali olmakta ve bilinen iki Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonunda da hidrojen peroksiti meydana getirilmesiyle ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyonla karşılaşmasıyla da istenilen ürünler meydana gelmektedir.

2.1.1.4. Singlet Oksijen ($^1O_2$):

Yapısında çiftleşmemiş elektronu yok olması sebebiyle serbest radikaller grubunun içerisinde yer almamakta ve grubun özelliklerini taşımamaktadır. Singlet oksijene ait yörüngelerin spinlerin yönleri birbirinden farklı (zıt) olduğundan oksijenin reaktif formu bu zıtlıktan ötürü yüksek seviyededir. Oksijen molekülünün özellikleri, singlet oksijeniyle karşılaştırıldığında singlet oksijenin oksijene kıyasla daha hızlı olduğu bilinmektedir.

Singlet oksijeni, oksijen şeklinde kullanılması istenildiğinde; aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şekline dönüştürerek vermesi gerekmektedir.

$$2O^- + 2H^+ \longrightarrow 2HO_2$$

2.1.1.5. HOCl (Hipokloröz asit):

Kimyasal formülü HOCI olan, suda hipokloröz asit ve hidroklorik asit oluşturacak şekilde çözülebilen zayıf bir asit olan hipokloröz asitin diğer ismi aktif klor olduğu bilinmektedir. Mikroorganizmalarda hipokloröz asit parçalayıcı etkisine sahip olmasından dolayı suyun içerisinde iyonizasyona uğrayarak yani hidroksil atomuna veya HOCI moleküllerine ayrışabilmekte ve tepkimesi aşağıda gösterilmektedir. Hipokloröz asit zayıf bir asit olmasının dışında pH 6'nın üzerindeki değerlerde çözülmekte ve pH 9'un üzerinde ise ortamda hipoklorit iyonu oluşmaktadır.

$$H_2O + CI_2 \longrightarrow HOCI + OH^-$$

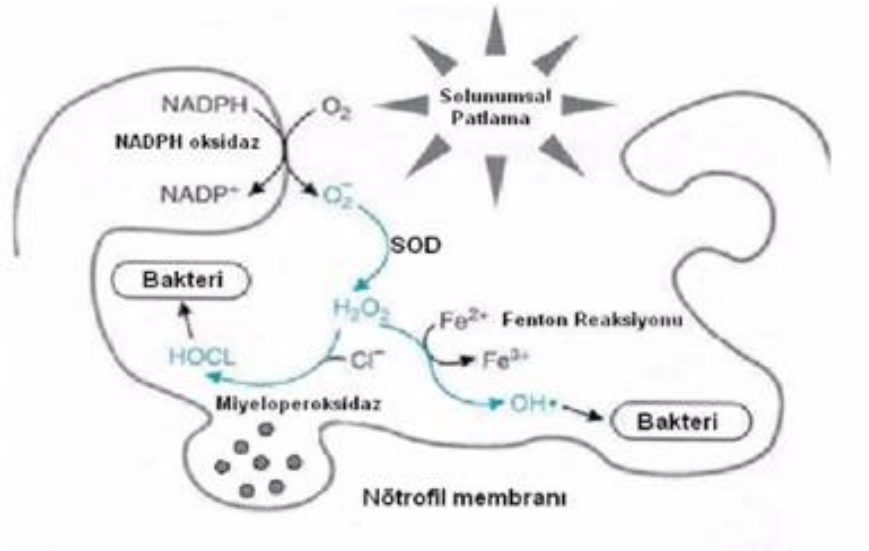
2.1.2. Hücredeki ROT Kaynakları

Enzimatik reaksiyonlar esnasında ara ürün olarak meydana gelen serbest radikaller, ortamda bulunan mevcut moleküler haldeki oksijenle de bir araya gelmektedir. Hücrelerde karşılaşılan reaktif oksijen türlerin kaynakları meydana geliş şekillerine göre gruplandırılarak biyolojik ve hücre içi kaynaklar olarak incelenmektedir.[7]

2.1.2.1. Biyolojik kaynaklar:

Biyolojik kaynaklarda ROT oluşumunun meydana gelişi;

- Solunum patlama: Organizmalardaki istenmeyen durumlara karşı ilk savunmayı başlatan aktive özelliğine sahip beyaz kan hücreleri, mitokondri dışında oksijen yapımında bir solunumsal patlama olayı göstererek ana ürün olarak serbest radikallerini meydana getirmektedir. Fagosite edilmiş mikroorganizma, bu patlama sonucunda fenton reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerinin etkisiyle de ortadan kaldırılmaktadır.



Şekil 2.1 Solunum patlamada oluşan ROT'lar

- Atomların etkileşimleri sonucu ortaya çıkan enerji türleri; vücudumuza gelen güneş ışınları ve atomların fazladan elektrona sahip olması gibi olağan durumlarda ortamda serbest radikal birikmesine yol açmaktadır. Güneş ışınlarının D vitaminini içerdiği bilinmekte ancak fazlası, cildin çabuk

yaşlanması ve kırışması gibi problemlere de neden olmaktadır. Aynı şekilde yoğun strese maruz kalarak işlerini yapan kişilerin vücutlarında gerektiğinden fazla serbest radikal üretilmektedir.

Bu istenilmeyen durum vücudumuzdaki depo edilmiş olan enerjinin çok erken tükenmesiyle birlikte aşırı yorgunluğa ve önlenemeyen serbest radikal birikimiyle de damarda sertleşmeleri de beraberinde getirmektedir.

2.1.2.2. İnstraselluer kaynaklar (Hücre içi)

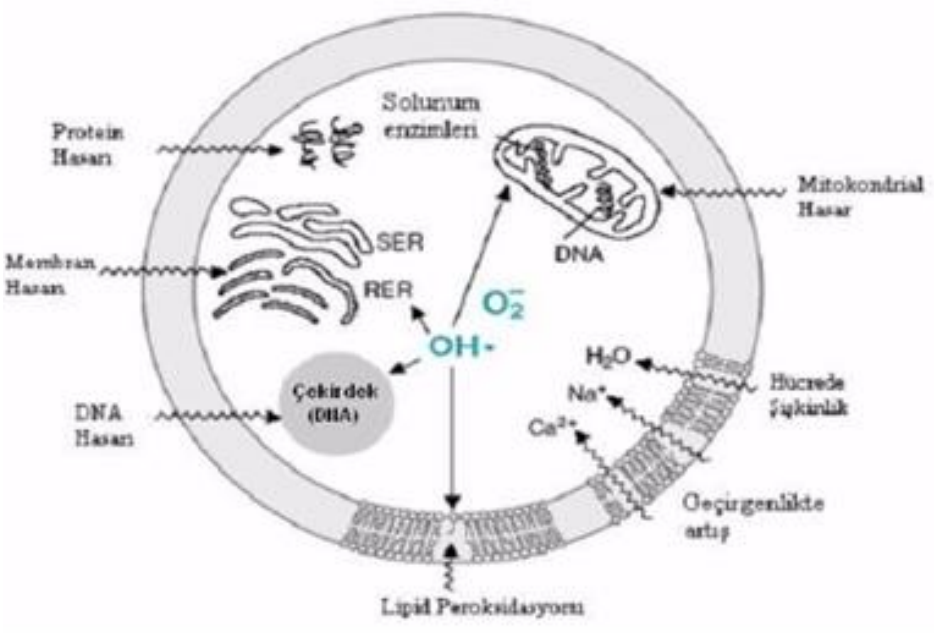
Hücreiçi kaynaklarda ROT oluşumunun meydana gelişi;

- Hücrelerde mitokondriyal elektron taşıma zinciri reaksiyonlarının gerçekleşmesi esnasında bir miktar sızıntı sonucu oluşmakta olup bazı koşullar altında da miktarları değişmektedir. Örneğin; mitokondri iç zarındaki oksidatif fosforilasyon zincirinin bileşenlerine indirgendiği zaman süperoksit radikalinin üretimi artmaktadır.
- Hücrelerin içerisinde bulunan bazı yabancı toksik maddeler serbest radikal üretimini arttırıcı etkisi sayesinde hem ortamda serbest radikal üretmekte hemde üretilmiş olan hazır haldeki serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi minimize etmektedir.
- Periyodik tabloda geçiş metallerinde yer alan özellikle demir ve bakır elementleri, fizyolojik koşullar altında elektron alıp-verme şeklinde oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görülmektedir. Geçiş metallerinin ortamda bulunması serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırması katalizör olarak görevli olduğunu göstermektedir.

2.1.3. Serbest radikallerin metabolizmaya etkileri

Serbest radikallerin metabolizma içerisinde oluşumu kimyasal maddeler gibi çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle artmakta olup bu artış neticesinde ortamdaki fazla serbest radikal, hücrenin savunma mekanizması ile yok edilmediği zaman, diğer moleküllerle tepkimeye girerek zincir reaksiyonun başlatılmasında görev almaktadır. Başlatılan zincir reaksiyon tamamlandığında yeni oluşan serbest radikallerin tepkimeye

girme yetenekleri çok güçlüdür ve biyomoleküller içerisinde yer alan karbonhidrat, protein, lipit ve DNA gibi önemli bileşikleri üzerinde de etkileri mevcuttur.[8]



Şekil 2.2 Radikallerin hücresel hedefleri

2.1.3.1. Lipitlere etkileri:

Tüm biyomoleküller üzerinde geri dönüşü olmayan büyük hasarlara sebebiyet veren serbest radikallerin en çok etkisi ilk sırada karbonhidratlarda daha sonra lipidlerde görülmüştür. Lipid peroksidasyonu, hücre hasarının oluş nedeni olup bunlarla birlikte ısı, ışık, radyasyon ve hızlı hücre bölünmesi gibi etkenlerle de bunlar arasında bulunmaktadır.

Hücrenin yapısındaki doymamış yağların serbest radikallerle reaksiyon sunucunda peroksidasyon ürünleri oluşmaktadır. Bahsedilen biyolojik membranlar, oksijen varlığı ve metal iyonları yönünden oldukça zengin olması, oksidatif hasara kolayca yakalanabilmesine yol açmaktadır.[9]

Lipit oksidasyon reaksiyonlarının tepkimesi; alkil grup ilk basamağında aktif radikal oluşumu olmakta ve dış faktörlerden ise, ısı, ışık veya metal iyonlarının varlığında alkil hidrojen atomu yapıdan ayrılmaktadır.[10] Atomdan ayrılan 1A grubundaki H atomunun bağlı olarak bulunduğu radikal da aktiflik özelliği kazanmaktadır.

Ortamdaki mevcut peroksit molekülü aynı yağ asidi zincirinde veya başka bir yağ asidi zincirinde bulunan H atomunu da yanına alarak stabil forma geçmek istemektedir.[11] Bir hidrojen atomuyla peroksitin reaksiyona girmesi sonucunda yeni bir aktif radikal oluşmakta olup oluşan ürün, katalizör görevi yaparak diğer tepkimedeki ara ürün basamağı olan peroksiti oluşturmadan, diğer bir aktif radikalle birleşerek de stabilite özelliği kazanmaktadır.

Periyodik cetvelde 2A grubunda bulunan bakır (Cu^{+2}) metallerin etkisiyle gerçekleşen oksidasyon reaksiyonları indirgenme-yükseltgenme olarak da oluşmakta ve tepkimelerdeki ilk ürün olarak hidroperoksitler oluşmaktadır.[11] Fakat bileşenlerine ayrıldıklarında ortamda kokulu karbonilli bileşikler olarak bilinen ve aldehit, ketonlar, aldehitlerin de yapısında bulunan hidrokarbonlar bulunmaktadır. Bu bileşiklerin karakteristlik özellikleri sayesinde az miktarlarda bile olsa yağların tatlarında ekşimsi tat ve kokularında hoş olmayan değişikliklere sebep olmaktadırlar.

2.1.3.2. Proteinlere etkileri:

Zincir tepkimelerinin yavaş ilerlemesinin nedeni proteinlerin yapısında bulunan serbest radikallerin miktarca fazla olması ve buna bağlı olarak da serbest radikallerle etkileşimlerinin değişkenlik göstermesidir. Bu değişim şu şekilde; yapısında çift bağı olan moleküller daha kolay reaksiyona girmekte ve reaksiyonlar neticesinde kükürt radikalleri veya karbon merkezli radikaller meydana getirmektedir.[12]

Yukarıda bahsedilen etkileşimden oluşan ürünler; organizmayı yabancı moleküllerin zarar verici etkilerine karşı erkenden uyarı yapan koruyucu molekül immünglobülin G ve sistein gibi proteinlerin yapılarının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu sebepten ötürü yapıları bozulan proteinler, vücudumuzun işleyişindeki bir takım görevleri yerine getirememektedir.[13] Methemoglobin; hemoglobin ve oksijenin kandaki oksitleme ajanlarının etkisiyle elde edilen bileşik olarak adlandırılmakta olup oksihemoglobinden daha dayanıklı olması oksidatif strese neden olmaktadır

2.1.3.3. Nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri:

DNA molekülü içerisinde oksidatif hasarın oluşumu 2 şekilde gerçekleşir ve 2.1.1.3'de anlatıldığı gibi 'Fenton Tepkimesi' OH^- hidroksil iyonunun radikallerinin

DNA'ya saldırması sonucunda ortamda bir hasar oluşmaktadır. Bu durumun oluşumu esnasında O_2^- gibi H_2O_2' de dolaylı olarak DNA'da hasara yol açar.[14]

Ayrıca, reaktivitesi çok yüksek olan OH radikalinin hücre içinde çok yoğun ortamdan az yoğun ortamda bulunan nükleusa geçebilme ihtimalinin düşük olmasına karşın bu zorluğu yaşamayan H_2O_2 ortamdaki Fe-Cu iyonları ile hidroksil radikallerini oluşturmaktadır.

2.1.3.4. Karbonhidratlara etkileri

Radikal eklenmesi ve radikal substitusyonunda reaktif ara ürün olarak yer alan serbest radikallerin, karbonhidratlar üzerindeki etkilerine verilecek en güzel örnek polisakkarit depolimerizasyonu sonucunda süperoksit ve okzalaldehitin oluşmasıdır. Oluşan bu iki ürünün patolojik olaylar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.[15]

Serbest radikaller hücreyi oluşturan moleküllerin bir elektronunu kendisine alarak stabiliteyi sağlarken aynı zamanda hücrenin sürekli hasara uğraması, fonksiyonlarını yitirmesine ve yok olmasına neden olmaktadır. Hücre hasarlara uğradığı zaman bu durumdan organlar da etkilenmektedir. Bu olay zincir şeklinde devam ederken hücre zarının yapısının bozulmasıyla da erken yaşlanmalar ve hastalıklar kendini göstermeye başlamaktadır. Antioksidanlar ise, buradaki kaybolan molekülleri yerine koyarak normal oksijen molekülleri oluşturup serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırmaktadır.

2.2. Antioksidanlar

Meyve ve sebzelerin tümünde farklı antioksidan yapıları görülmekte ve bunların birçoğu, kabuklarında bulunan kuersetin ve yeşil çaydaki epigallokateşin gibi flavonoid yapılarında da bulunmaktadır.[16]

Antioksidanlar, karşılaşılan hasara karşı ilk savunmayı başlatan ve sağlığın korunması açısından da çok önemli yapıların oluşumuna katkıda bulunduğu yapılan araştırmalarda kanıtlanmaktadır. Antioksidanlar; vücudumuzun bulunduğu ortamlarda sigara kullanımı ve hava kirliliği arttırılması, hastalıklar karşısında alınan ilaçlarda daha fazla üretilmektedir.[18] Son derece gelişmiş olmasına rağmen karmaşık bir yapıya sahip olan antioksidan koruma sistemimiz, vücudumuzun sistemlerini reaktif oksijen

türlerinden korumaktadır. Bu sistem, iç ve dış kaynaklara bağlı olarak birçok farklı bileşenlerden oluşmaktadır.

Daha önceden de bahsedildiği üzere antioksidanlar, LDL oksidasyonunu önleyerek damar sertliğinin ilerlemesini engellemekte olup hastalıklarının oluşumunda çok önemli bir rol oynadığı görülmektedir.[21] Vücudumuza aldığımız E vitamini de LDL oksidasyonuna karşı gösterilen direnci arttırdığını ve LDL oksidasyonu oranını ise ters orantılı olarak azalttığını göstermektedir.

2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Makalelerde genelde iki gruba ayrılarak incelenmekte ve bunlar düşük konsantrasyonlarda oksidasyona uğradığı bilinmektedir.[22] Yediğimiz birçok besin aracılığıyla alınan antioksidanlar; vitaminler, karotenoidler, organosülfür bileşenler ve mineraller şeklinde sıralanmaktadır.

2.2.1.1. ENZİMLER:

Süperoksit Dismutaz (SOD):

Fizyolojik görevleri; oksijeni metabolize ederek hücreleri zararlı etkilere karşı korumak ve bir diğer görevi ise; süperoksidin daha az toksik özelliği olan H_2O_2'ye dönüşümünü katalizlemektir.[27] SOD enzimi, hem ortama H_2O_2 üretimini sağlayan hemde H_2O_2'yi ortamdan uzaklaştıran enzimlerle birlikte çalışabilme özelliği bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde bulunanlar incelendiğinde organellerde bulunanlar sitozolde dimerik, mitokondride tetramik ve hücre dışı sıvısında ise ESCOD enzimin 3 izoformu görülmektedir.[34]

$$O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Katalaz (CAT):

Katalaz enzimi, dört hem grubu içerisinde yer alan bu enzim hayvansal kaynaklı olmayıp, ortamdaki oksijenle beraber metabolizmanın bazı aşamalarında ürün olarak sentezlenmektedir.[28] Aşağıda tepkimesi verilen hidrojen peroksitin büyük bir kısmı, katalaz enzimiyle su ve oksijene ayrılmakta ve bir kısmı da glutatyon peroksidaz enziminin etkisiyle yıkılmaktadır. Bilinen bir diğer görevi ise; Hem hidrojen peroksitin

ortadan kaldırılmasında hemde hidroksil radikali oluşumunun önlenmesinde bu enzim rol oynamaktadır.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{KATALAZ}} H_2O + O_2$$

Fosfolipit Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px):

Glutatyon peroksidaz (GPx), aktif bölgesinde periyodik cetvelin 4.periyot 6A grubundaki selenyum atomu bulunan dört tane protein alt ünitesinden meydana gelmektedir.[30] GPx'nin 2 temel fonksiyonu; hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin ortamdan temizlenmesinde ve hidrojenperoksiti indirgenmiş glutatyonla bağlayarak su molekülünün oluşmasında rol oynamaktadır.

Bu reaksiyonların gerçekleşmesi esnasında birebir tepkimeye giren indirgenmiş glutatyon (GSH) ile yarısı kadar hidrojen peroksit birleşerek yükseltgenmiş glutatyon ve 2 molekül suya dönüşen tepkimesi aşağıda verilmektedir.(GSSG)

$$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPX} GSSG + 2\ H_2O$$

Glutatyon organizmada birçok metabolik olayların işleyişinde görev almakta ve kendi enziminin oluşması için gereken kofaktörünü sağlamaktadır. Memeli dokuları üzerine yapılan araştırmalarda yüksek derişime sahip indirgenmiş glutatyona rastlanmaktadır. Glutatyonlar da serbest radikallerle tepkimeye girerek reaksiyon sonunda oluşacak olumsuzlukları engellemektedir.[32]

$$2G\text{-}SH + H_2O_2 \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + H_2O$$

$$2G\text{-}SH + ROOH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + ROH + H_2O$$

$$GSSG + NADPH^+ + H^+ \longrightarrow 2\ G\text{-}SH + NADP^+$$

Yukarıda tepkimesi verilen indirgenmiş glutayonun yapısı incelendiğinde tiyol (-SH) içeren bir tripeptit, disülfid bağları olan ve ağırlık miktarı düşük bir molekül olduğu kanıtsanmaktadır.[32] Glutatyonların içerisindeki disülfid bağlarına herhangi bir molekülün bağlanması sonucunda kendine has özelliklerinden olan indirgeyici özelliğini kaybetmektedir. Bu özelliğin kaybının diğer bir sebebi ise, GSSG'nin GSH'a dönüştürülmesinden kaynaklandığı da bilinmektedir.

2.2.1.2. Yağda ve suda çözünenler:

Askorbik Asit :

L-askorbik asit (3-keto-L-gulofuranolaktan), bütün canlı dokularında bulunmakta olup özellikle insan vücudunda akciğer ve göz gibi hayvansal dokularda oldukça yüksek yoğunlukta bulunmaktadır.[33] Askorbik asit; suda çözünürken C_2H_5OH az çözünmekte C_2H_5-O-C_2H_5 çözeltisi içinde çözünmemektedir.

Son yıllarda ilerleyen fermantasyon teknolojisi ile yapılan çalışmalar esnasında önemli bir bileşen ketogulanik asitin üretim maliyetlerinin düşürülmesine katkı sağladığı kanıtsanmaktadır.[34]

Bu önemli bileşiğin görevleri şu şekildedir:

- pH kontrolü sırasında asit düzenleyici olması,
- Gıda ürünleri içerisinde asidik bir tat verici olması,
- Ürünleri raf ömrünün uzun kalmasını sağlaması,
- Bazı endüstrilerde kullanılarak ürünün rengini varlığını sürdürmesi

Dışarıdan tedarik edilen askorbik asidin tuzları, yağlarla oluşturdukları oksidasyona karşı tepkisiz kalmaları suda çözünürlüklerinin fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Askorbik asitin dehidroaskorbik asite dönüşmesi tersinir bir tepkime ile gerçekleşmekte olup oksidatif esmerleşme olayını da önlemektedir.

Gıdalara sonradan ilave edilen C vitamini antioksidan olarak kullanıldığında kendi vitamin değerini minimize etmektedir. Bunun oluşmaması için; ilk olarak zenginleştirilecek olan ürünü kararlı hale getirilecek ve serbest oksijen ortamdan uzaklaştırılacaktır.[38] Periyodik cetveldeki 3B grubunda yer alan bakır ve demir gibi ağır metallerin varlığı oksidasyonun derecesi arttırmakta ve bu artış askorbik asiti negatif olarak etkilemektedir.

α-Tokoferol:

Hem lipofilik özelliği bulunan hem de antioksidan olan diğer bir vitamin olan ‘E’ yapısında fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halkası, sayısız alkil gruplarından oluştuğu yapılan araştırmalarda bulunmuştur.[40] α-tokoferol radikali kararlılık özelliğinin olmaması ve reaktivitesinin oldukça düşüklüğü nedeniyle glukuronik asit ile konjugasyona uğraması işleminden sonra vücudumuzda bulunan safra kesesi ile

ortamdan dışarı yollanmaktadir. Yapılan laboratuvar çalışmalarında α-tokoferol ile glutatyon peroksidazın serbest radikallere karşı birlikte hareket etmesi birbirini tamamlayıcı etkisi olduğunu kanıtsamaktadır.[41]

Anderson'un (2007) yaptığı diğer bir çalışmada ise; metabolizmamıza dışarıdan verilen α-tokoferol'un 'koroner' olarak bilinen hastalığına yakalanma riskinin azalttığını ve nitrozaminlere dönüşümünü engelleyerek, antikarsinojen etkisini ortaya çıkarmıştır.

Karotenoidler:

Bitkilerin bünyesinde var olan ve renk pigmentleri olarak bilinen karotenoidlerin görevleri; fotooksidatif proseslere karşı koyarak bitkilerin korunmasını sağlamaktır. β-karoten; vitaminler içerisinde en fazla A vitamininde olmasına karşın özellikle $^1O_2$ ve O_2 radikallerini ortamdan giderilmesinde etkili antioksidanlar olarak da bilinmektedir.

Karotenoidlerin kaynakları; likopen ve A vitaminin öncüsü olan β-karoten'dir. Yapılan çalışmalarda kan plazmasında yüksek miktarlarda β-karoten bulunan kişilerde kansere yakalanma riskinin olmadığını öte yandan sigara kullananlarda dışarıdan aldıkları beta-karoten ile bu riskin yükseldiği kanıtlanmaktadır. Fotooksidatif süreçler esnasında vücudumuzdaki organlarda ve derimizde bazı hastalıkların oluşumuna sebebiyet vermekte olup bunların içerisinde en bilineni ROT'un oluşumudur. Örneğin, yaşa bağlı olarak körlüğe neden olan maküler hasarın oluşmaması için özellikle gözün retinasında bulunan, iki kareotenodine önemin verilmesi gerekmektedir. β-karotenoidin diğer özelliği, güneş yanıkları sonucunda oluşan deri hastalıklarına karşı koruyucu bir görev üstlenmektedir. Aynı zamanda beta-karotenoid ortamdaki reaktif türlerin uzaklaştırılmasında C ve E vitamini de yardımcı olmaktadır.[43]

Karotenoidler yıkıma uğradıkları zaman birçok ürün elde edilmektedir. Bunlar; iyononlar, damaskonlar ve damaskenonlar olmak üzere parfüm endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kokulu maddelerdir.

Flavonoidler:

Flavonoidler, bitkisel kökenli ve güçlü antioksidan özellikleri olup C6-C3-C6 difenilpropan yapısında fenil gruplarının arasında üçlü karbon bağlarıyla oksijen halkasına bağlı olarak gösterilmektedir. Flavonoidler de kendi içerisinde gruplandırılmakta olup bunları birbirinden ayıran özelliklerden başlıcaları; hidroksi

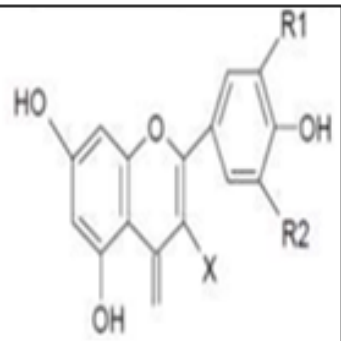
gruplarının sayısı, doymamışlık derecesi ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyidir.

Flavonlar ve Flavonoller:

Flavonoidler bitkisel kaynaklı olanlarda bol bulunmakta olup bitkilerin ikincil metabolitlerini oluşturmaktadır. Flavonoidlerin konjugasyon ürünlerinin oluşumu ise; hidroksil gruplarına şeker, metil, sülfat ve benzeri grupların stabil yerlerinin değişmesiyle meydana gelmektedir.

Quercetin, flavonol grubunda bulunması ve yapısındaki 3 C atomuna bağlı OH^- (Hidroksil)'in rutinozun ile bulunduğu yerlerinin değişmesi 'flavonoid rutin' olarak isimlendirilmektedir.[45] Bunlar; antioksidan özelliklerini sergileyebilmeleri için ortamda mutlaka serbest radikal bulunmalı ve tepkimeye girerek radikalleri etkisiz hale getirmektedir.

Tablo 2.2. Flavonollar ve flavonların kimyasal yapıları



Flavonlar (X=OH)	R1	R2	Flavonlar (X=H)	R1	R2
Kamferol	H	H	Apigenin	H	H
Kuarsetin	OH	H	Luteolin	OH	H
Mirisetin	OH	OH	Krisoeriol	OCH3	H
İseramnetin	OCH3	H	Trisin	OCH3	OCH3

Flavonoidlerin etki mekanizmaları;

a) Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijeni bulunan ortamdan yok etmektedir.

b) Peroksil radikalini ve alkoksil radikalini bir süre tutarak, lipid peroksil zincirini kopartarak bozulmasını sağlamaktadır.

c) Siklooksigenaz ve lipooksigenaz içerisinde bulunan enzimlerini etkisiz hale getirerek görevlerini engellemektedir.

d) Periyodik cetvelde yer alan 3B grubundaki demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlamaktadır.

Flavanonlar:

Flavanon glikozidleri, turunçgil meyvelerinde özellikle portakalda bol miktarda bulunan ve yapılarına bakıldığında genellikle glikozid formdadırlar. Flavanonlar; bunların sularına acımsı bir lezzet vermekte olup bu grubun içerisinde yer alan floretin ve floridzin dihidrokalkonlarla kimyasal yapısı benzemekte ve gıda bileşenleri olarak kullanılmaktadır. Meyvelerin içerisinde özellikle de elma ve armutlarda çok fazla flavanon bulunduğu bilinmektedir. Bunların içerisindeki dihidrokalkonaların bir kısmı ise, gıda sanayisinde tatlandırıcı olarak gıdalara ilave edilmektedir.

İzoflavonoidler:

İzoflavonoidlerin yapıları incelendiğinde bulunan bulgular; fitoostrojenlerin bir alt grubunda yer aldığı, çeşitli baklagillerde ve bazı meyve-sebzelerde bulunan bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerden olduğu bilinmektedir. Basit fenollerden oluşan fitoöstrojenler, kimyasal olarak çeşitli yapıları bulunmakta olup izoflavonlar - izoflavanlarında içinde bulunduğu gruplar olarak sınıflandırılır.

Bu grubun içerisinde yer alan izoflavonoidlerin görevi, kandaki kolesterol düzeyinin seviyesinin ayarlanmasını sağlamaktadır. İzoflavonoidler üç temel aglikon formunda olup bunların isimleri sırasıyla genistein, daidzein ve glisitein soya fasulyesidir.

Glutatyon (G-SH):

Glutamik asit, sistein ve glisinden birleşmesiyle meydana gelen ve vücudumuzun hemen hemen tüm hücrelerinde var olan bir tripeptit olarak yer almaktadır. Başlıca görevleri arasında; hücre zarını zararlı maddelerden korunması, oksidatif hasarın engellenmesi ve aminoasitlerin hücre içerisine taşınması yer almaktadır.[46] Suda kolaylıkla çözünen bir antioksidan olmasının dışında serbest radikallere de kolayca indirgemesiyle bilinmektedir.

Ürik asit:

Ürat plazmasında bulunan ve pürin metabolizmasının tamamlanmasıyla son ürün olarak elde edilen ve suda kolaylıkla çözünen bu madde, plazmanın içerisindeki askorbik asidi kararlı hale getirmektedir. Lipid radikalleri üzerinde de herhangi bir etkisi

bulunmayan ürat (120-410 μM/L), normal plazma konsantrasyonlarındaki bazı iyon haldeki O_2^-, OH^- ve $^1O_2$ yapılarını da ortamdan uzaklaştırmaktadır.

Melatonin:

Görevi fazla salgılanarak kansere karşı koruyucu etki göstermektedir. Fakat pineolasit hücreler ışığa karşı fazla duyarlı oldukları için mutlaka karanlık ortamlarda bulunmaları gerekmektedir. Bunlara ilave olarak melatonin hormonunun yaşlanmayı geciktirici etkisi de bulunmaktadır.

α- Lipoik Asit:

Suda ve yağda çözünebilen, oksitlenmiş veya indirgenmiş iki sülfür molekülünü bünyesinde barındıran güçlü ve etkili bir antioksidan özelliği bulunmaktadır.
Bu sayılabilen özelliklerinden ötürü diğer antioksidanlardan daha çok serbest radikal türüne karşı etkili olmaktadır.[48]

Alfa lipoik asit, vücutta biyomoleküllerin enerjiye dönüştürülmesi sürecinde rol oynamakta ve kan şekeri seviyelerinin düzenlenmesinde görev alarak şekerin metabolizmaya verebileceği zararı minimize etmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde yüksek hücre yenileyici özelliği sayesinde günümüzde kozmetik ürünlerinde E, C ve A vitaminlerinin yanı sıra α- Lipoik Asit de çok sık rastlanmaktadır.

2.2.1.3. Metal iyonlarını bağlayıcı proteinler:

Periyodik cetvel içerisinde 3B grubunda yer alan geçiş metallerinin önemi; meydana gelen oksidan hasarını dolaylı yoldan hızlandırmaktır. Geçiş metalleri içerisinde bulunan 3B grubuna ait demir ve bakır iyonları ortamdaki reaktif bileşenlerle birleşerek onların daha reaktif şekillere dönüşmelerini sağlamaktadır. Organizmada taşıyıcı protein olarak bulunan demirin 2/3'ün hemoglobinde, az kısmı miyoglobinde ve kalan kısmı da ferritin de tutulmaktadır.

2.2.1.4. Eksojen antioksidanlar

Vitaminlerin arasında yer alanlar:

- E vitamini
- β-karoten

İlaçlar arasında yer alanlar:

- Rekombinat süperoksit dismutaz.
- Trolox

Gıdalarda bulunanlar:

- Butylated hydroxytoluene (BHT) ve Butylated hydroxyanisole (BHA) :
- Sodyum benzoat
- Propil gallat,
- Süperoksit dismutaz,

2.3.Gıdalardaki Antioksidanlar

2.3.1. Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar; güvenilirliği ve zarar verecek yan etkisinin bulunmaması nedeniyle sentetik antioksidanlara göre daha çok tercih edilmektedir. Enzimatik antioksidanlar sürekli üretilmesinin yanısıra alınan gıdalar sayesinde de savunma sistemimizi güçlendirmektedir. Antioksidanlar, gıdaların yapısında doğal olarak bulunabilirken Maillard gibi birçok kimyasal reaksiyonlar sonucunda da bu özelliğe kavuşabilmektedir.

Gıdalardaki mevcut flavonoidler çok güçlü antioksidan aktivite yeteneğine sahip olabilmektedir. Yapılan araştırmalarda kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere, diğer rahatsızlıkların oluşumu tüketilen meyve-sebze ile ters bir orantı olduğu görülmektedir.[50] Antioksidan aktiviteye sahip vitaminler ve karotenoidler daha önceden de bahsedildiği üzere vücudumuzu hastalıklardan korunmasını sağlayan bileşikler içerisinde sayılmaktadır.

2.3.2. Sentetik antioksidanlar

Geçmiş yıllardaki birçok araştırmacı tarafından da BHA ve BHT'in canlı organizmalarda karsinojenik etkileri varolabileceği bildirilmektedir.[51] Bitkiler; karotenoidler, flavonoidler ve tokoferollerin de içerisinde yer aldığı birçok doğal antioksidan maddeyi bünyelerinde bulundurmaktadır.

Bu maddelerin özelliği ise protein, lipit ve DNA gibi biyomoleküllerin üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olmasıdır. Bunların dışında doğal antioksidanların, lipit oksidasyonundaki etkisi sentetik antioksidanları kullanım avantajı sağlamaktadır.[52]

Günümüzde meyvelerin ve bunlardan elde edilen içeceklerin antioksidan özellik taşıyan polifenolik bileşikler yönünden oldukça zengin olması, sağlık üzerine faydaları, içerdikleri fenolik antioksidanlara bağlanmaktadır. Bunların dışında hidroksi sinnamik asitler de bulunmakta olup C vitaminin yüksek olduğu turunçgil meyvelerinde bu yüzden antioksidan etkisinin de daha yüksek olduğu bilinmektedir.

Yapılan araştırmalarda fenolik bileşiklerin yararlı etkilerinin bulunması, bu maddelerin serbest radikalleri nötraliz etmekte yardımcı olan antioksidan olduğunu kanıtsamaktadır. Kırmızı taneli meyveler grubunda yer alan böğürtlenin de antioksidan kapasitesinin yüksek olması çeşitli enzim aktivitelerine bağlanmaktadır.

2.4. Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri

Son yıllarda üzerinde durulan bir diğer konu; antioksidanların 'oksidatif streste bariyer görevi görmesi' olmasıdır. Fakat gıdalardaki mevcut antioksidan yapısının karmaşıklığı sebebiyle istenilen sonucu elde edememektedir. Çünkü bu bileşiklerin bağlarının ayrılması ve üzerinde çalışılması hem çok zor hemde bütçeleri oldukça fazla olması bunlardan bazılarıdır.

Günümüzde ***in vitro*** laboratuvar koşulları altında antioksidan kapasiteyi ölçmeyi hedefleyen pekçok araştırmacı, analiz metodlarını kimyasal reaksiyonlarına göre 2'ye ayrılarak incelenmektedir:

2.4.1. HAT temelli metodlar

2.4.1.1. ORAC: Oksijen Radikali Absorplama Aktivitesi :

İlk uygulanırken prob olarak β-fikoeritrin ve peroksil radikali konulmuş daha sonra da AAPH ilave edilerek reaksiyon başlatılmaktadır. Bu metodun kullanılmasının tek amacı ise; çeşitli ekstraktlarla birlikte fitokimyasalların antioksidan aktivitesinin miktarını ölçmektir. Fakat kullanılan probun fotostabil olmaması ve polifenolik maddelerle etkileşim içerisine olması reaksiyonu başarısız kılmaktadır. β-PE yerine

fluoressein değiştirilerek tepkimenin olumlu sonuçlanması sağlanmaktadır. Bu tercih edilişin sebebi protein olamayan sentetik bir prob olmasıdır.

Bu uygulamada kullanılan AAPH, reaksiyon ilerledikçe ortamda bulunan fluoressein flüoresansın azalmasına ve hatta bitmesine neden olmaktadır. Eğer ortamda belirli miktarda antioksidan bulunuyorsa, mevcut AAPH radikalleri yok edilerek flüoresansın azalması durdurulmaktadır.[54]

2.4.1.2. TRAP: Toplam Radikal Kapanı Antioksidan Parametresi:

Wayner ve ekibi, (1985) plazma içerisindeki antioksidan kapasitesini ölçmek için bu yöntemi kullanmıştır. Bu metot sırasında APPH ve ilave edilmekte ve sonrasında reaksiyon boyunca oksijenin miktarının azalması izlenmektedir.

Plazmadaki antioksidasyonlar indüksiyon süresi boyunca bir miktar yavaşlatmakta ve bu süreler Trolox kullanılan reaksiyonun süresiyle karşılaştırılmaktadır.

APPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinden flörasan probunu koruyabilme özelliği olup bu yöntemin en büyük avantajı; flüoresansı geciktirilmesini sağlaması ve antioksidanların bozulmasını engellemekte olması olup dezavantajı ise; oksijen elektrodunun uç noktalarının gereken zaman boyunca stabilizelerinin sağlanmamasıdır.[56]

2.4.1.3. TOCS: Toplam Radikal Yakalayıcı Aktivitesi:

Bu yöntem Winston ve ekibi tarafından bitki dokularındaki antioksidan kapasitesinin alfa-keto-γ-methiobutirik asidin oksidasyonunun ile üretilmesi esasına dayanmaktadır. Üretilen bu ürün ortamda bulunan antioksidanlar tarafından engellenmekte ve 'head space'in gaz kromotografisi bu şekilde izlenmektedir.

2.4.1.4. Krosin veya Beta Karoten Ağartma Metodu:

Tekli bileşenlerle kompleks yapıları aynı anda analiz edebilmesiyle tercih edilen krosin beyazlatma yöntem Lussignoli ve ekibi tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Bu metotun dezavanatajı oluşan diazo bileşenlerinin ısı veya ışık etkisi ile oksidasyona uğrayarak bozunmasıdır. Bu bozunma peroksil radikalini oluşumuna ve renk kaybına yol açmaktadır.

2.4.1.5. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi:

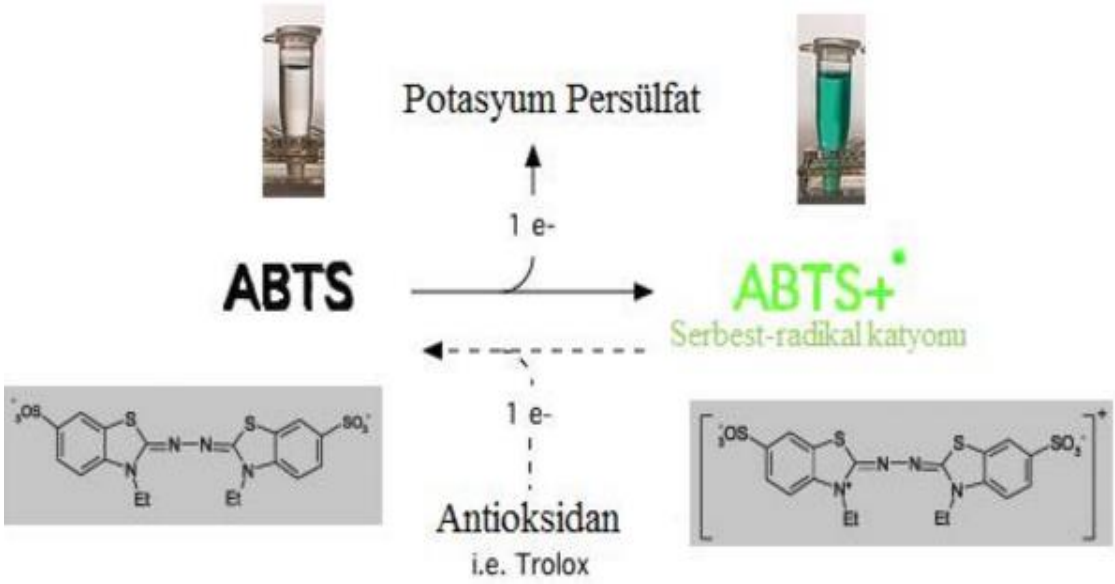
Valkonen ve ekibi, TRAP yönteminin esaslarına uygun; peroksi radikali üretmektedir. Bunun için yine AAPH kullanılmakta ve substrat olarak da DCFH-DA tercih etmektedir. Bu sayede DCFH-DA'nın yükseltgenmesiyle indirgen özelliği kazanması ve Diklorofloresin'e dönüştürülmesi sağlanmaktadır. DCF'nin üretimi iki şekilde ölçülmektedir. Bu gerçekleştirilen yöntemlerde cihazdaki okunan dalga boyu 504 nm'de en yüksek absorbansa sahip olduğu bilinmektedir.

2.4.2. ET temelli metodlar

2.4.2.1. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi:

Re ve ekibi; tarafından geliştirilen yöntem gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Yöntem H_2O_2 ile tepkimeye giren metmiyoglobinin ferrilmiyoglobin oluşmasıyla sonlanmaktadır.[39] Eğer ABTS radikal katyon oluşması istenmiyorsa, bu oluşumdan önce 2,2-azinobis ilave edilmektedir.

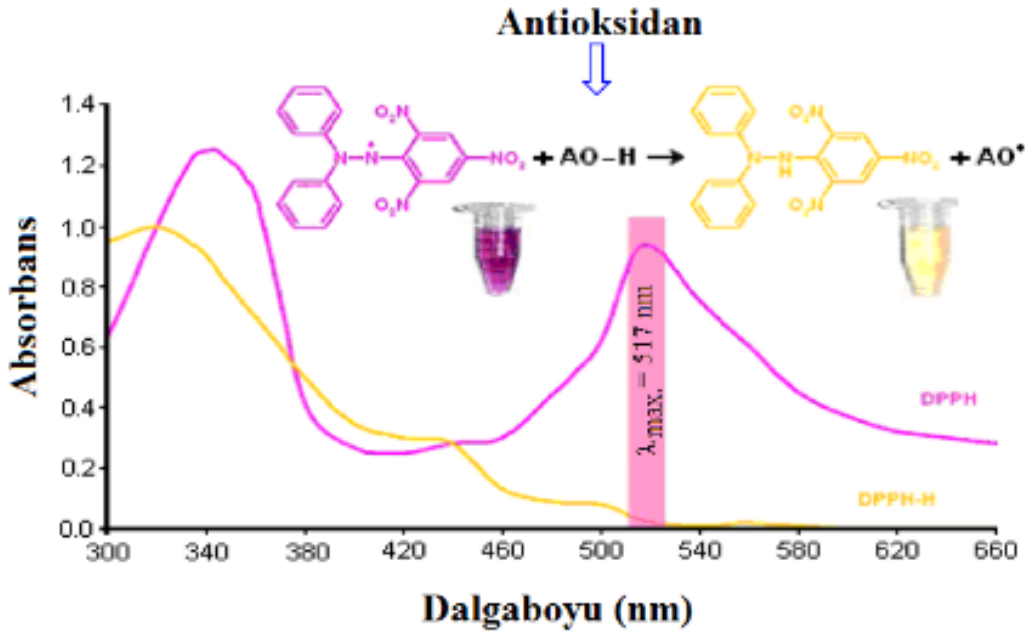
Yapılan çalışmalarda ABTS'nin oksidasyonu sayesinde tepkimenin başlaması devam eden süreçle ABTS'deki renk değişimi gerçekleştirilmektedir. Analiz sırasında ABTS çözeltisine seyreltme işlemi uygulandıktan sonra yaklaşık 10 dakika bekletilerek absorbans değeri ölçülmektedir. Bu yapılan işlemlerden sonra 1 mL çözelti ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktların oluşturdukları diğer karışımlarda ölçülmektedir.



Şekil 2.3 ABTS Yöntemi

2.4.2.2. DPPH Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi:

Ortamda bulunan antioksidanlar, Şekil 2.4' da gösterildiği gibi 517 nm absorbans değerindeki DPPH serbest radikalinin AO-H ile tepkimeye girmesiyle ortamdaki H^+ miktarının azalmasına neden olmaktadır.

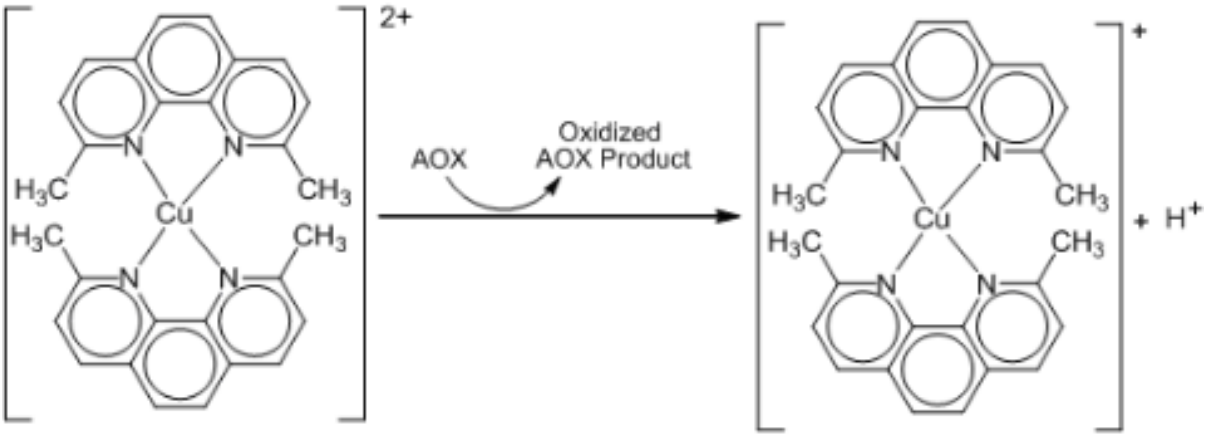


Şekil 2.4 DPPH radikali ve antioksidan (AO-H) tarafından indirgenmesi

2.4.2.3. CUPRAC Yöntemi:

CUPRAC reaksiyonun tepkimesi Şekil 2.5' da gösterilmektedir. Bu oluşan kompeksin spektrum cihazında 450 nm' de max absorbans gözlenmektedir. Bakır (I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) şelatına indirgenme yeteneği ile kapasitesi hesaplanmaktadır.

Özellikle araştırmacıların CUPRAC metodunun (TAC) analizinde tercih edilmesi pH'ın kolay ayarlanabilmesidir.

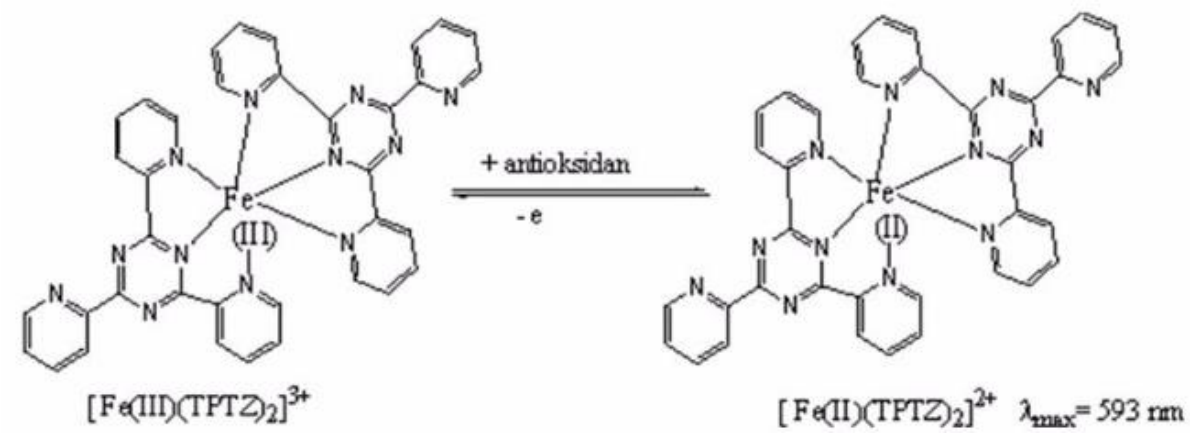


Şekil 2.5 CUPRAC reaksiyonu ve kromoforu

2.4.2.4. FRAP Yöntemi:

Miktarca az oluşan Fe^{+3}'ün, TPTZ ile reaksiyonundaki yeni ürün Şekil 2.6' da gösterilmektedir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan koyu mavi renginde $Fe(II)(TPTZ)_2$ kompleksinin oluşum süresi 4 dakika ve spektrumunda değeri 593 nm'de olduğu bilinmektedir.

FRAP yönteminin sonuçlarının 4 dakikadan uzun sürmesi; reaksiyonda varolan bazı fenollerden kaynaklanarak yavaşladığı düşünülmektedir. Kullanılan bu yöntem; içerisinde demir iyonu bulunduran antioksidanların aktivitesi tespiti için uygulanmaktadır.



Şekil 2.6 [Fe(II)(TPTZ)2] oluşumu

2.4.2.5. FCR ile Toplam Fenolik Yöntemi:

Geçmiş yıllarda ilk defa Singleton ve ekibinin antioksidanlardaki toplam fenol miktarını belirlediği bu yöntemde; fenolik bileşiklerin molibdenyum'a elektron (aktarması)/transferi edilmesi gerçekleştirilmektedir. Meydana gelen yeni kompleks ürünün oluşumu 750-760 nm'de absorbans değeri okunmaktadır.[52]

Yöntem uygulanırken standart bileşik olarak gallik asit kullanılsa da yapılan incelemeler neticesinde gallik asitle hemen hemen aynı değeri veren; diğer asitlerle de aynı tepkimenin gerçekleşmesi mümkündür.

FCR ayıracı ticari olarak satın alınmakta olup bu yöntemi genellikle doğal gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kullanılan yöntem basit, tekrarlanabilir ve güvenilir olması avantajları olarak bulunurken dezavantajları ise; uzun sürmesi, masraflı olması ve sulu fazda gerçekleştiği için lipofilik bileşikler için uygulanamamasıdır.

2.5. Çalışmada Kullanılan Meyve:

Dut Ağacı, farklı birçok türleri olup hemen hemen bütün iklim koşullarında yetişebilen bir ağaç türüdür. Yetiştirilen toprağın özelliğine göre ömürleri uzundur. Dünyamızda dut meyvesini bolca yetiştiren ülke Çin'dir. Bu ağaç türünün özellikleri; kalın bir gövde ve bu gövde üzerinde de birsürü dallar ve kalp şeklinde yapraklar yer almaktadır. Dut ağaçları yaklaşık 18 metreye kadar uzayabilmektedir.

Dut ağaçları; hem acı hem tatlı tada sahiptir ve farklı renklerde meyveleri bulunmaktadır. Dut ağacının dünya genelinde yetiştirilen 15 farklı türleri var olup bunlardan bazıları;

-Çin Dutu,
-Morus Wittiriom Dutu,
-Morus Trilobota dutu,
-Ihlamur Dutu,
-Kırmızı Dut,
-Himalaya Dutu,
-Morus Notabalis Dutu,
-Kara Dut,
-Teksas Dutu,
-Moğol Dutu,
-Afrika Dutu,
-Ak Dut (Deneyde kullanılan)
-Morus Cathayana Dutu,
-Morus Liboensis Dutu,
-Morus Macroura dutu

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Meyve Örneği

Yapılan deneylerdeki meyve materyali; beyaz dut evimizin bahçesi içerisindeki dut ağacından mevsiminde toplanarak elde edildi. Toplanılan bu beyaz dutlar saplarından ve yapraklarından ayıklandıktan sonra bir kısmı gölgede kurutuldu, diğer kısmı ise analizlerde kullanılmak üzere ışığı geçirmeyen koyu renkli şişelerde muhafaza edildi. Deneylerde kullanılacak tüm çözeltiler analiz sırasında hazırlanarak taze olarak kullanıldı.



3.1.2. Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan başlıca ekipmanlar ise;

- Çalkalamalı Su Banyosu (Clifton)
- Rotary Evaporatör (Buchi R-200)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- pH- Metre (Wtw Ph 330i),
- Vortex (Fisons)
- Hassas Terazi (Gec Avery)
- Mikropipetler (200 µl-1000 µl Eppendorff Mikropipet),
- Isıtıcı ve Manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31)
- Yüksek vakumlu, soğutmalı liyofilizatör

Çalışmada kullanılan kimyasallar ise;

- Etanol,
- Metanol,
- Asetik asit,
- Demir (III) klorür,
- Potasyum hekzasiyanoferrat,
- Tween 20,
- Amonyum tiyosiyanat,
- Folin Ciocalteau reaktantı
- Linoleik asit,
- Sodyum karbonat,
- DPPH,
- ABTS,
- Gallik asit,
- Beta karoten,
- L- askorbik asit,
- Demir (II) klorür,
- Potasyum klorür
- Sodyum asetat trihidrat,

3.2. Yöntem

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen deneylerdeki amacımız kullanılan beyaz dutun antioksidan aktivitesi;

- Folin-ciocalteu yöntemiyle,
- DPPH radikal yakalama metoduyla,
- ABTS radikal katyonu yakalama metodu,
- Süperoksit Radikali Giderme metoduyla,
- Metal şelatlama,
- İndirgeme potansiyeli,
- Linoleik asit emülsiyon metodu,

- Toplam fenolik madde içeriği;
- Toplam flavonoid madde miktarı olarak çalışıldı.

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanışı

Deneyde kullanılan beyaz dut materyalimiz kurutulduktan sonra mutfak rondosunda öğütüldü ve çözücü olarak su, aseton ve etanol kullanılarak ekstrakları hazırlandı. Hazırlanan ekstraktların bir miktarı 250 ml sıcak suda 20 dakika boyunca devamlı karıştırılarak ekstrakte edilerek süzgeç kâğıdında süzüldü. Elde edilen bu beyaz dut ve yaprak ekstraktları TÜTAGEM'de liyofilize işlemine tabi tutuldu. C_2H_6O ve C_3H_6O ekstraksiyonları 25'şer g örnek 300 ml çözücü ile çalkalamalı su banyosunda 350 rpm'de 2 saat inkübe edilerek işlem sonucunda süzgeç kâğıdı kullanılarak süzüldü. Süzülen çözücüler evaparatörde 46 ºC sıcaklıkta uçuruldu.

Hazırlanan beyaz dut örnekleri ekstrakte işlemi sonucunda elde edilen bileşiğin miktar tayini için liyofilize ve evapore öncesi-sonrası olarak tartımları alındı. Antioksidan aktivite denemelerimde çalışacak çözeltiler analiz öncesinde ışığı geçirmeyen renkli şişelerde +4 ºC'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1 Rotary evaporatör ile çözücü uzaklaştırma işlemi

3.2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Farklı çözücülerle hazırlanan meyve ve yaprak ekstraktları içerisindeki toplam fenolik bileşik maddelerin içerikleri Slinkard ve Singleton tarafından bulunan FCR metoduna göre belirlendi.[53] Folin Ciocalteu'nun fenol reaksiyonu sırasında renk değişimi polifenolik bileşiklerin miktarı ile orantılı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Bu metod uygulanırken gallik asit ve pirogallol tercih edildi.

Meyve ve yaprakların 1000 µg/ml derişimlerinde hazırlanan su, aseton ve metanol ekstraktlarından 1ml alınarak hacimleri 46 ml'ye tamamlandı. Deney tüpünün üzerine Folin-Ciocaltaeu reaktifi (2,5 ml) ve Na_2CO_3 çözeltisi de eklendi. (%20'lik 7,5 ml) Bütün çözeltiler su banyosunun içerisinde 2 saat kadar bekletildi.

Meyve ve yaprak ekstraktlarımız metanol, etanol, aseton ve saf su kullanılarak hazırlanan örnek çözeltilerle de aynı işleminin uygulaması için de tekrarlandı. UV Spektrofotometrede 760 nm dalga boyuna karşı hazırlanan dut örneklerinin reaksiyon sonucundaki absorbans değerleri okundu.

Örneklerin TPC miktarları µg gallik asit eşdeğeri çizilen absorbansa karşı – konsantrasyon grafiğinin denkleminden yararlanarak bulundu.

3.2.3. DPPH Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Meyve ve yaprak ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi Blois'in kullanmış olduğu metoda göre belirlendi.

Meyve ve yaprak ekstraktlarının tepkime sonucunda bir H^+ veya e^- kaybetmesi sonucunda reaksiyon karışımının absorbansının düşmesine neden olmaktadır. Bu doğrultuda DPPH çözeltisinin renginin açılması ve yüksek serbest radikal giderme aktivesi göstermektedir.

50- 250 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan meyve ve yaprak ekstraktlarının üzerine hazırlanan 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml eklendi. Bu çözelti karanlık bir ortamda 30 dakika inkübe edilerek absorbansları okutuldu.

3.2.4. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Kullanılan metotun esası; linoleik asit oksidasyonu oluşum esnasında Fe^{+2} iyonları Fe^{+3} iyonlarına yükseltgenmesidir. Buradaki kilit nokta belirli zaman aralıklar da peroksitlerin oluşmasını spekrofotometrik olarak takip edilmesidir. Gözlemlenen yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunun gösterir.

Değişik konsantrasyonlardaki meyve ve yaprak ekstraktlarından 1 ml alındı. Daha sonra içerisine 2.5 ml linoleik asit ve (pH=7) 0.02 M fosfat tampon çözeltisinden de 1.5 ml ilave ederek iyice karıştırıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımı ağzı kapalı plastik olan santrifüj tüplerinin içine konuldu. Plastik tüpler içerisindeki çözeltilerden

10 saat aralıklarla 0.1 ml alınıp 3.7 ml %75 C_2H_5OH ve 0.1 ml %3 NH_4SCN çözeltisi ilave edildi. Daha sonra çözeltilerin üzerine son olarak 0.1 ml $FeCI_2$ (20mM) çözeltisi eklenerek oluşan çözeltinin absorbans 500 nm'de gözlemlendi.

Bu işlemlerden sonra doğruluğundan emin olunması için 3 kez tekrarlanarak sonuçların ortalaması alındı. Okunan absorbans değerlerine göre lipit peroksidasyonu inhibisyonu yüzdesi hesaplandı.

3.2.5. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Meyve ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama tayini Zhao ve arkadaşlarının uygulamış olduğu metoda göre yapıldı. Tepkimede genellikle Fe^{+2}/ferrozin kompleksinin oluşumu gözlenmektedir. Fakat şelatlama gücü yüksek olduğunda bu durum meydana gelmemektedir.

50-100-150-200-250 µg/ml hazırlanan beyaz dut meyve ve yaprak ekstraktları ve standart çözeltiler saf suyla seyreltilerek deney için hazırlandı. Çözeltilerin 1 ml'si üzerine 0.05 ml 2mM $FeCI_2$ çözeltisi ilave edilerek oda koşulları altında 30 dk'lık inkübasyon işlemi uygulandı.

Daha sonra 0.02 ml 5 mM ferrozin çözeltisi eklenerek vortekslendi. Bu işlemler diğer çözeltiler içinde 10 dk bekletilip 562 nm'de absorbansı alındı. Şelatlama aktivite yüzdesi aşağıdaki denklemdeki gibi; 562 nm'deki örneğin absorbansının, kontrol absorbansına bölünüp 100 ile çarpımıyla hesaplanır.

3.2.6. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Nishimiki ekibinin (1972) kullandığı yöntemde, NADH /PMS /O_2 sistemi ile üretilen süperoksit radikalinin, renginin değişmesi ilkesine dayanmaktadır. Üretilen ürünün sarı olan NBT'yi mor renkli formazana indirgemesidir. Ortamda bulunan olan bileşikler cihazda uygulanan yöntem sonucunda düşük seviyede absorbans değeri vermektedir.

Farklı derişimlerde hazırlanan beyaz dut meyve ve yaprak ekstraktlarına ve standart çözeltilerine 1 ml ilave olarak 1 ml 156 mM (Tris-HCI tamponunda, pH=8) konuldu. Daha sonra bütün çözeltilere 1 ml 468 mM NADH (Tris-HCI tamponunda, pH=8) eklendi. Bu çözeltilere son olarak 100 mM PMS (Tris-HCI tamponunda, pH=8)

daha ilave edildi. Reaksiyon için belirlenen sıcaklık ve zamanda beklenerek absorbansları okundu.

3.2.7. İndirgeme Kapasitesi Tayini

Oyaizu ekibinin (1986) bulduğu metoda göre; Fe^{+3} iyonlarını Fe^{+2} iyonlarına indirgenerek, $FeCI_3$ eklenerek Prusya mavisi renginde oluşan ürün kompleksinin absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yapılan deneylerde okunan absorbans değeri aynı zamanda indirgeme kapasitesinin değerine eşittir.

Farklı ekstraktlardan alınarak hazırlanan 1 ml örneğe; sırasıyla 2.5 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH=6.6) ve 2.5 ml $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi konuldu. Belirlenen süre bekledikten sonra 50 ^{0}C'de inkübe işlemi uygulandı. İnkübe işleminden sonra 2.5 ml TCA (%10) ilavesiyle tekrar 2000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Oluşan çözeltinin üst tabakasından 2.5 ml alındı. Alınan üst tabakaya 2.5 ml saf su ve 0.5 ml $FeCI_3$ (%0.1'lik) çözeltisi eklenip iyice karıştırılarak 700 nm'de absorbans değeri okundu.

3.2.8. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Meyve ve yaprağın su, aseton ve metanol ekstraktlarındaki toplam flavonoid madde içeriğinin belirlenmesi, Zhishen ve arkadaşlarının bulmuş oldukları metoda göre belirlendi.

Hazırlanan çözeltilerin 1000 µg/ml derişimlerde C_2H_5OH ve CH_3OH ekstraktlarından 10 ml alındı. 1ml $NaNO_2$ çözeltisi (%5) ilavesiyle 6 dk bekletildi. 1ml NH_4NO_3 çözeltisi (%10) konuldu. Tepkime sonucunda flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturuldu. Bu işlemler bittikten 5 dk sonra 10 ml NaOH çözeltisi (% 4.3) ilavesi ile birlikte saf suyla 25 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti iyice karıştırıldıktan sonra köre karşı 510 nm'de absorbans değeri ölçüldü.

Denemeler standart çözeltileri (gallik asit-kateşin) içinde aynı şekilde yapılarak cihazda okunan absorbans-konsantrasyon grafiği çizildi. Çizilen grafiğin denklemlerinden faydalanarak flavonoid madde miktarları mg olarak hesaplandı.

3.2.9. ABTS Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Bu aktivite tayinin belirlenmesinde ilk olarak ABTS çözeltisi hazırlandı. 7 mM ABTS çözeltisi ve 2.45 mM $K_2S_2O_8$ çözeltisi tepkimeye girerek ABTS radikalini

oluşturuldu ve oluşan radikal 12 saat karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan çözelti deneyden önce fosfat tamponuyla 0.7±0.025 olacak şekilde seyreltildi.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerin 3 ml 'sine ilave olarak 1 ml ABTS çözeltisi eklenerek 30 dk bekletildi. Tepkimenin en verimli değeri 734 nm absorbansında ölçülmüştür.

3.2.10. Değerlendirme

Beyaz dut meyvesi ve yaprak ekstraklarına yönelik yapılan deneyler 3 kez tekrar edilerek ortalaması alındı. Grafikler ve hesaplamalar excel programında yapıldı.

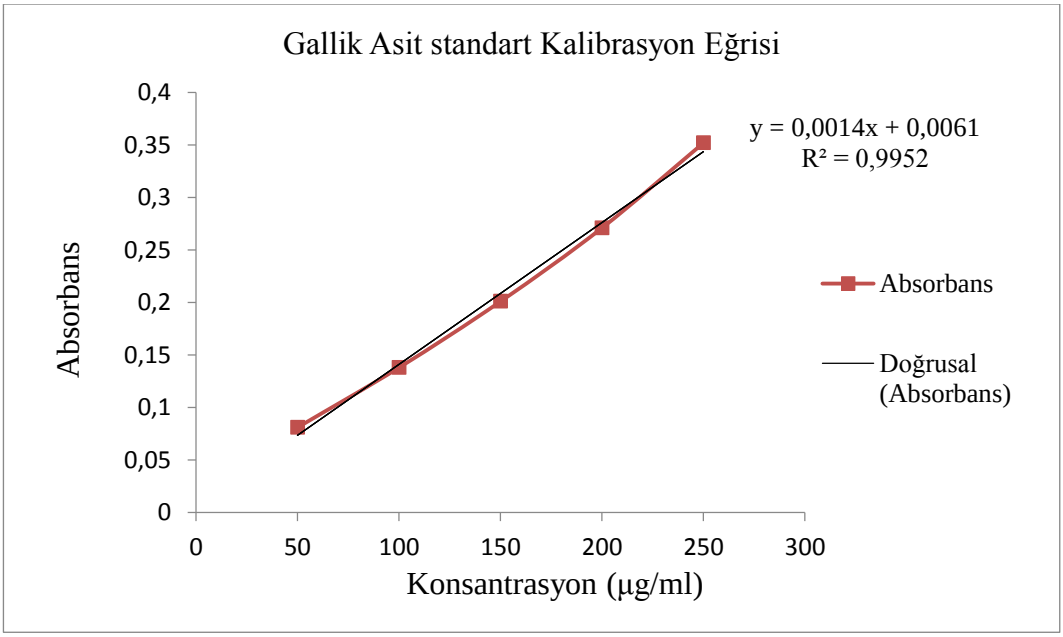
4. BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toplam Fenolik Madde Analizi

Tsa ekibinin (2005) dutun antioksidan aktivitesi için, belirli işlemlerden geçerek toplam fenolik içeriği ve antioksidan etkisi arasında ilişki olup olmadığını *in vitro* ortamda incelenmiştir.[31] Bu çalışmanın uygulanabilirliği açısından antioksidan aktivite değerini ölçmeden önce dutun ekstrakları hazırlanmıştır. Antioksidan aktivite ile dutun fenolik içeriği arasındaki bağlantıyı belirtmek için de özel bir reaktif olan 'Folin-Ciocalteau' kullanılmıştır.

Toplam fenolik madde tayini (TFM) analizinde, örneklerin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilerek öncelikle gallik asit kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Gallik asitin aseton çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 50-250 µg/ml konsantrasyon aralığında gallik asit çözeltisi kullanılmıştır.

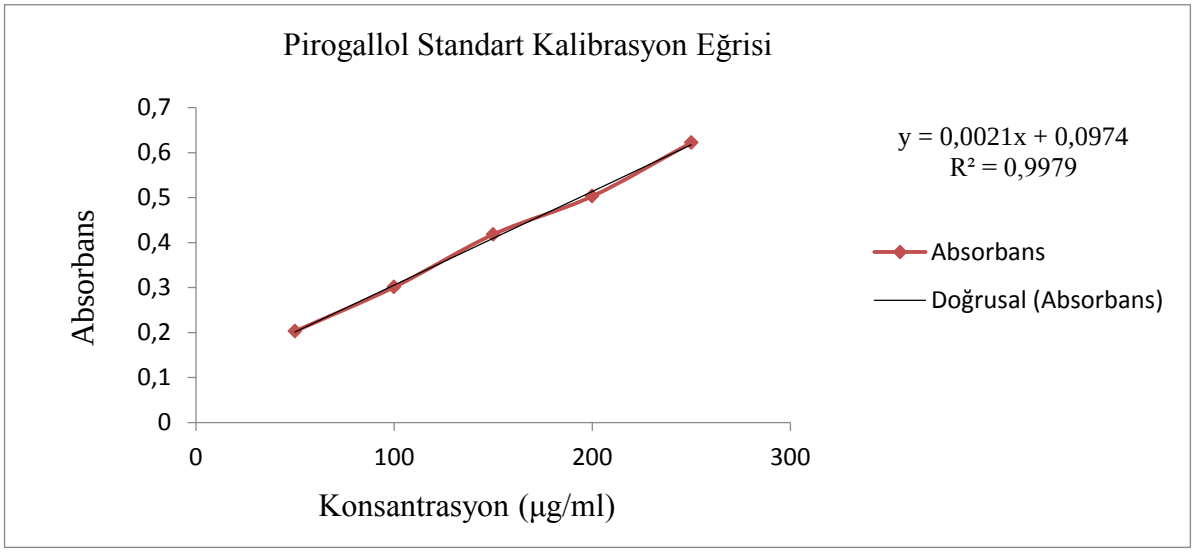


Şekil 4.1 Gallik asit standart grafiği

Meyve ve yaprak ekstrektlerinde toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesinde yapılacak hesaplamalar için gerekli olan gallik asit standart eğrisinden faydalanılmıştır. Bu grafik Şekil 4.1'de verilmiştir. Standart eğrilerin oluşturulmasında analizde elde edilen verilerden eğrileri tanımlayan eşitlikler belirlenmiştir.

Tablo 4.1 Örneklerin gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı

ÖRNEK	MİKTAR
Yaprak-su	72,786 (µgGA/g)
Yaprak-Metanol	84,214 (µgGA/g)
Yaprak-Aseton	129,929 (µgGA/g)
Dut-su	73,500 (µgGA/g)
Dut- Metanol	135,36 (µgGA/g)
Dut- Aseton	106,643 (µgGA/g)



Şekil 4.2 Pirogallol standart grafiği

Meyve ve yaprak ekstrektlerinin toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesinde yapılacak hesaplamalar için gerekli olan pirogallol standart eğrisinden

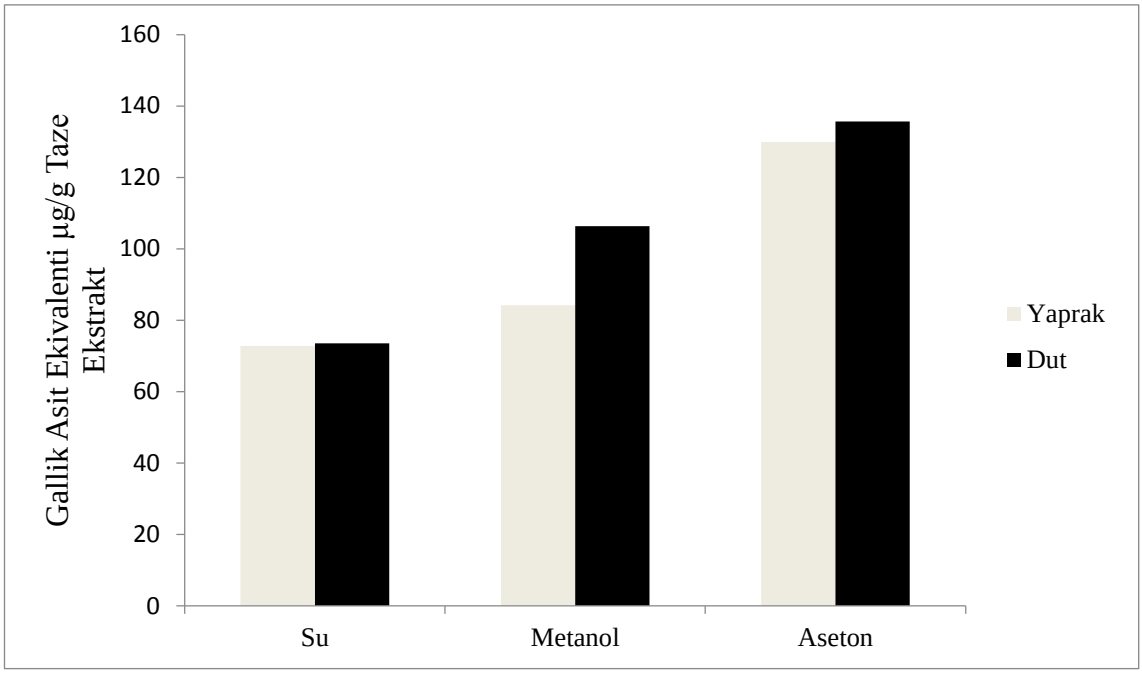
faydalanılmıştır. Bu grafik Şekil 4.2'de verilmiştir. Standart eğrilerin oluşturulmasında analizde elde edilen verilerden eğrileri tanımlayan eşitlikler belirlenmiştir.

Tablo 4.2 Örneklerin pirogallol cinsinden toplam fenolik madde miktarı

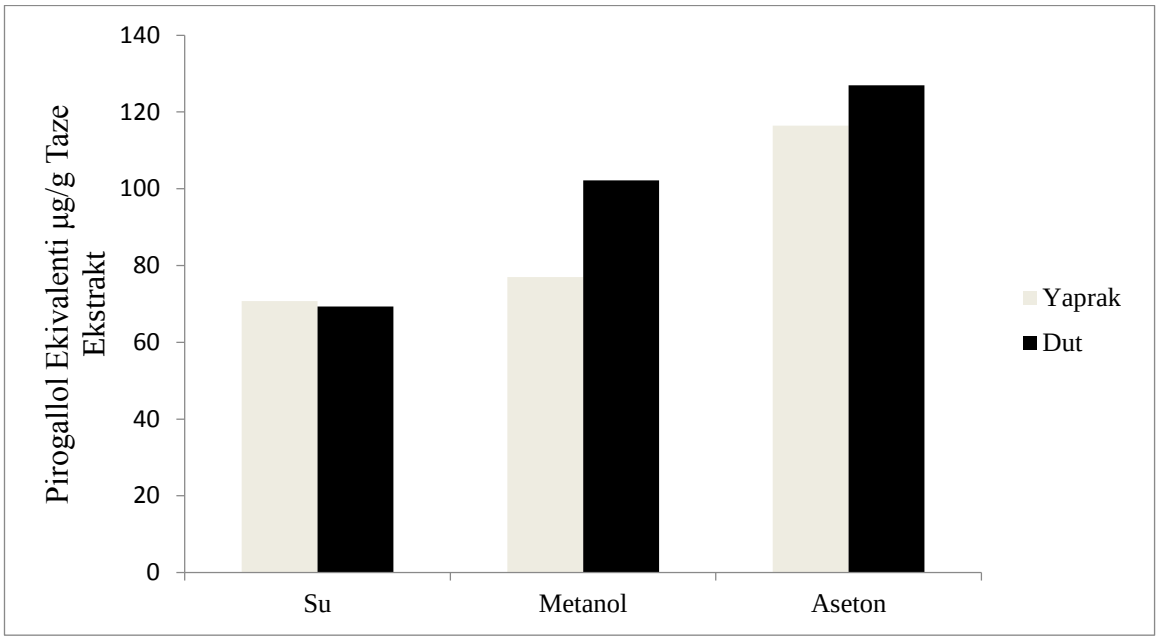
ÖRNEK	MİKTAR
Yaprak-su	70,762 (µgGA/g)
Yaprak-Metanol	76,952 (µgGA/g)
Yaprak-Aseton	116,476 (µgGA/g)
Dut-su	69,333 (µgGA/g)
Dut- Metanol	102,190 (µgGA/g)
Dut- Aseton	126,952 (µgGA/g)

İki farklı tayin yöntemi sonucunda meyve ve yaprak ekstrelerinin antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Bulunan sonuçlar Tablo 4.2'de meyve - yaprak ekstrelerinin gallik eşdeğerlerine eşdeğer miktarları olarak verilmiştir. Toplam fenolik madde tayini olarak en yüksek değer metanol ekstratında gözlenmiştir ve çözücü farklılığına göre; 'metanol > aseton > su' şeklinde sıralanmıştır.

Fenollerin hidroksil gruplarının serbest radikalleri yok etme gücü sebebiyle çok önemli olduğu bilinmektedir.[31] Çalışmalar çok çeşitli türde toplam fenol ve antioksidan aktivite arasında paralel bir ilişki olduğunu gösteririr.



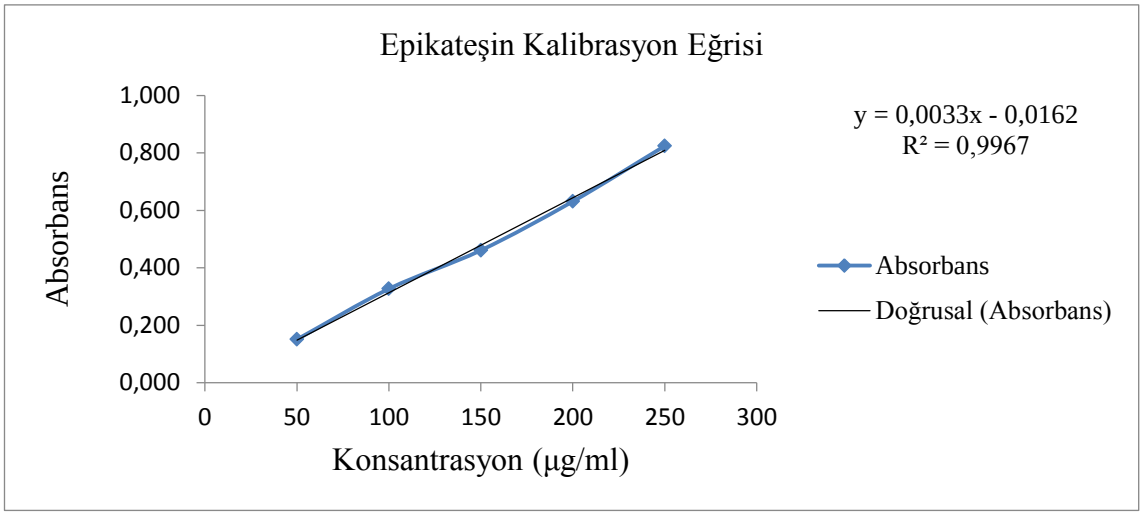
Şekil 4.3 Örneklerin gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı



Şekil 4.4 Örneklerin pirogallol cinsinden toplam fenolik madde miktarı

4.2. Toplam Flavonoid Analizi:

Flavonoidler genel olarak fenolik bileşiklerin en önemli üyesidir. Yapılan çalışmalar sırasında ekstrakların toplam flavonoid içerikleri epikateşin eş değeri olarak hesaplandı.



Şekil 4.5 Epikateşin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.3 Örneklerin epikateşin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı

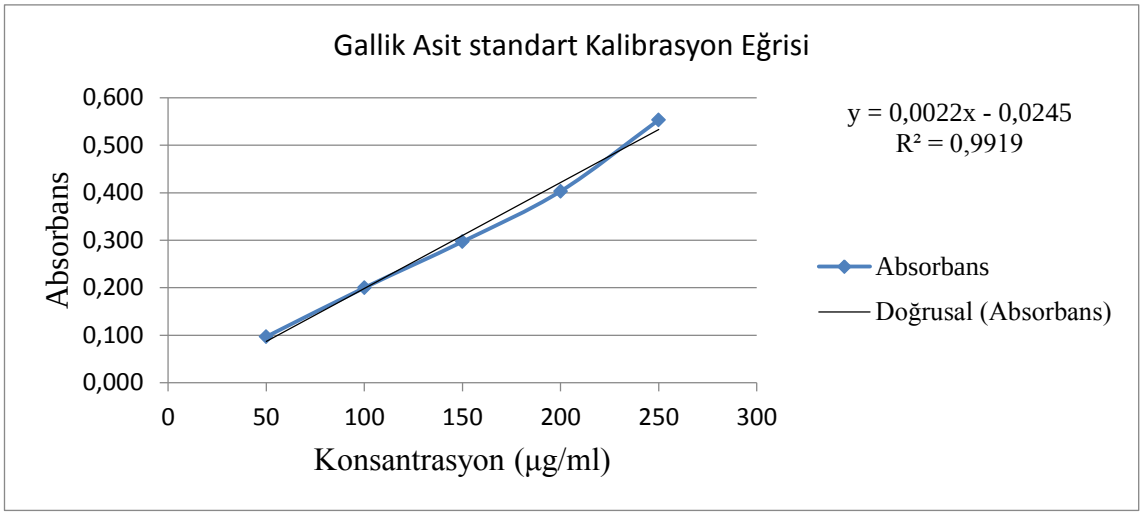
ÖRNEK	MİKTAR
Yaprak-su	15,515 (µg/g)
Yaprak-Aseton	22,182 (µg/g)
Yaprak-Metanol	19,455 (µg/g)
Dut-su	20,364 (µg/g)
Dut-Aseton	36,225 (µg/g)
Dut-Metanol	34,364 (µg/g)

Toplam flavonoid içeriği açısından yaprak ekstraklarını:

Aseton (22,182) >metanol (19,455) > su (15,515)

Toplam flavonoid içeriği açısından meyve ekstraktlarını:

Aseton (36,225) > metanol (34,364) > su (20,364)



Şekil 4.6 Gallik asit standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.4 Örneklerin gallik asit cinsinden toplam flavonoid madde miktarı

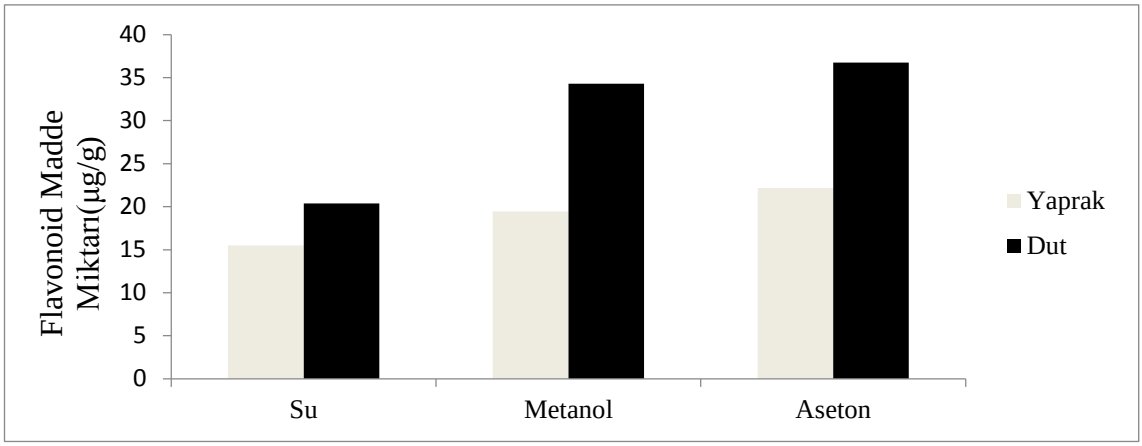
ÖRNEK	MİKTAR
Yaprak-su	17,955 (µg/g)
Yaprak-Aseton	28,409 (µg/g)
Yaprak-Metanol	32,500 (µg/g)
Dut-su	25,227 (µg/g)
Dut-Aseton	41,591 (µg/g)
Dut-Metanol	43,409 (µg/g)

Toplam flavonoid içeriği açısından yaprak ekstrakları :

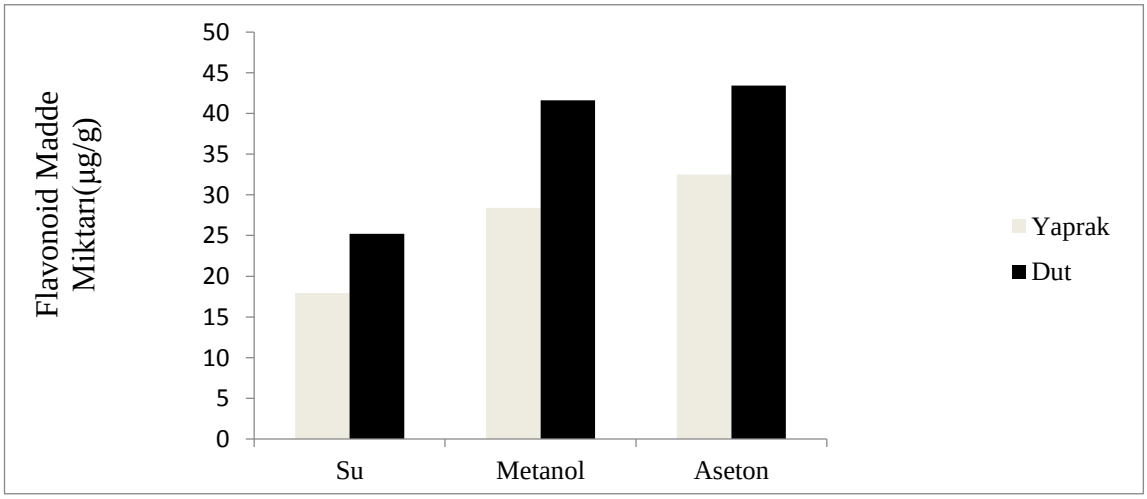
Metanol (32,500) >Aseton (28,409) > su (17,955)

Toplam flavonoid içeriği açısından meyve ekstraktları :

Metanol (43,409) >Aseton (41,591) > su (25,227)



Şekil 4.7 Örneklerin epikateşin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı



Şekil 4.8 Örneklerin gallik asit cinsinden toplam flavonoid madde miktarı

Çalışılan meyve-yaprakları ekstraktelerinden elde edilebilen içerikler karşılaştırıldığında; dut-metanol daha yüksek flavonoid madde içerdiği bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda en düşük flavonoid madde içeriği Dut-su ekstraktında bulunmuştur. Grafik denklemlerinden yararlanarak bulunan sonuçların 15,515 µg/g–36,727 µg/g arasında değiştiği belirlendi.

4.3. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi

Antioksidan kapasite tayinleri içinde en yaygın olanı serbest radikal süpürme veya yakalama aktivitesidir. Bu doğrultu da farklı radikallerin kullanılmasına rağmen en görülen DPPH'dır. IC_{50} değeri; meyve-yaprak ekstraktın radikalin yarısını yok ettiği

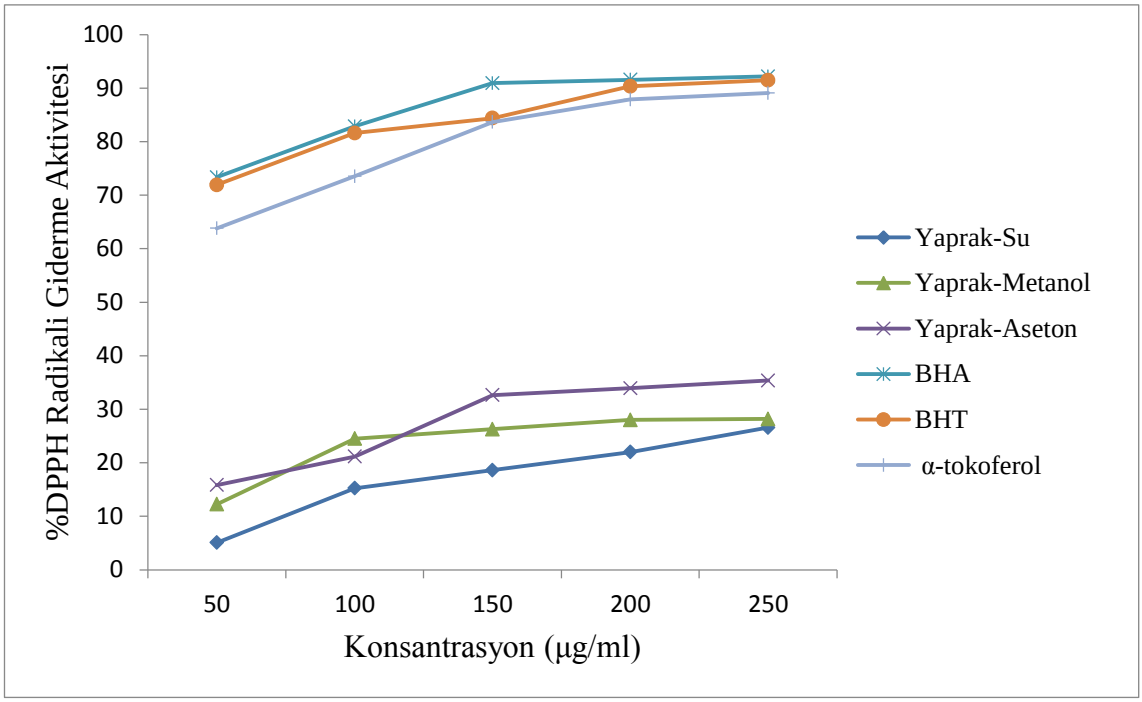
konsantrasyon hesaplanarak yorum yapıldı. Meyve-yaprağın her bir ekstraktın konsantrasyon-inhibisyon grafikleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Çizilen grafikten yararlanarak her bir ekstraktın IC_{50} değeri Tablo 4.3 'de verilmektedir. IC_{50} değeri ile serbest radikal yakalama aktivitesi arasındaki bağlantı ters orantılıdır. Bu durumda BHT'nın değeri, meyve-yaprak ekstraklarından daha yüksektir.

Tablo 4.5 Örnek ekstraktlarının EC50 değeri

ÖRNEK	EC50
Yaprak-su	15,82 (µg/g)
Dut-su	25,81 (µg/g)
Yaprak-metanol	20,23 (µg/g)
Dut-metanol	34,58 (µg/g)
Yaprak-aseton	25,61 (µg/g)
Dut-aseton	37,31 (µg/g)

Tabloda görüldüğü üzere, örneklerin ortalama EC50 değerinin (µg/g DPPH) standart BHT'ye ait EC50 değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu veriler neticesinde genel olarak, dut meyvelerinin antioksidan aktivitesinin BHT'den daha az olduğu söylenebilir.



Şekil 4.9 Yaprak ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktiviteleri

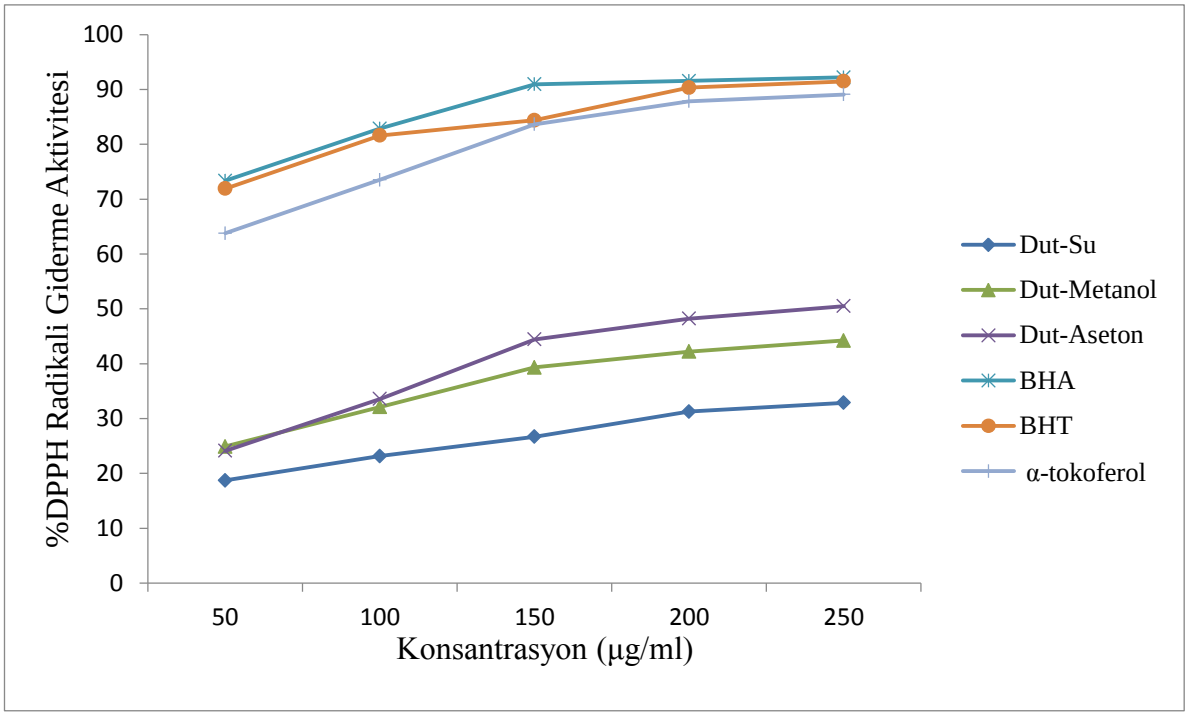
Yaprak ekstraktlarının;

* su ekstraktlarının; %5,076, %15,228, %18,613, %21,997, %26,565
* aseton ekstraktlarının; %15,832, %21,163, %32,633, %33,926, %35,380
* metanol ekstraktlarının; %12,259, %24,518, %26,270, %28,021, %28,196
* BHT'nin; %71,908, %81,592, %84,372 %90,316, %91,467
* BHA'nın; %73,339, %82,855, %90,934 %91,562, %92,190,

*α-tokoferolün; %63,791, %73,521, %83,651, %87,864, %89,067 ait % radikal giderme değerlerine sahip oldukları görüldü.

250 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla;

BHA > BHT > α-tokoferol > aseton > metanol > su olduğu belirlendi. (Şekil 4.7)



Şekil 4.10 Dut ekstraktlarının DPPH radikal giderme aktiviteleri

Meyve ekstraktlarının;

* su ekstraktlarının; %18,732, %23,156, %26,696, %31,268, %32,891
* aseton ekstraktlarının; %24,118 %33,568, %44,429, %48,237, %50,494
* metanol ekstraktlarının; %24,928 %32,133, %39,337, %42,219, %44,236,
* BHT'nin; %71,908, %81,592, %84,372 %90,316, %91,467
* BHA'nın; %73,339, %82,855, %90,934 %91,562, %92,190,

*α-tokoferolün; %63,791, %73,521, %83,651, %87,864, %89,067 ait % radikal giderme değerlerine sahip oldukları görüldü.

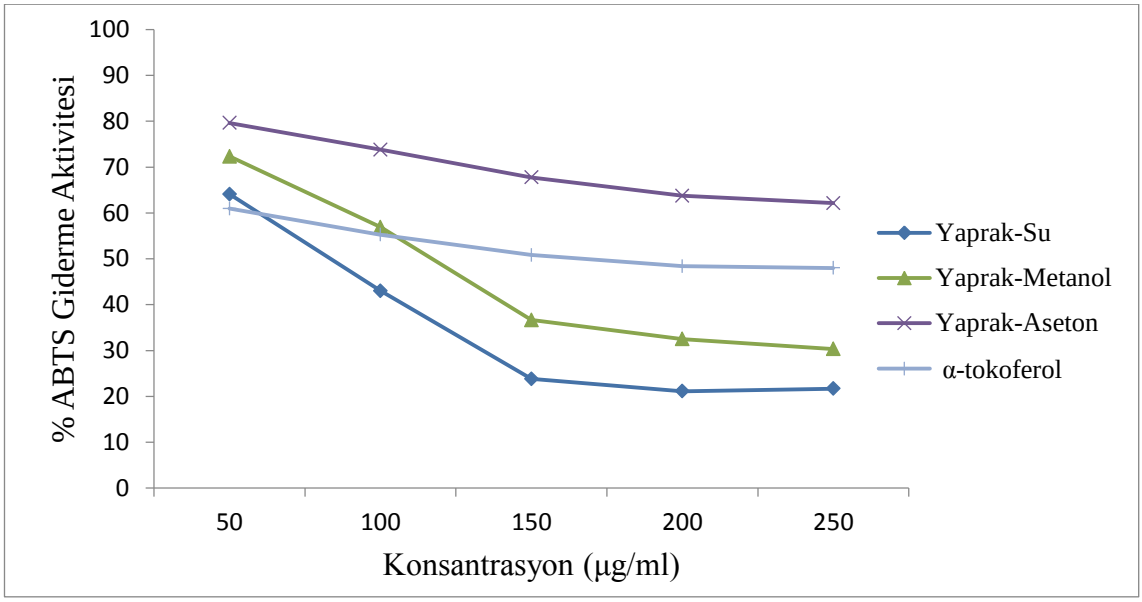
Standartların ve meyvenin su, aseton ve metanol ekstraktlarının radikal giderme aktivitesinin

250 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla;

BHA > BHT > α-tokoferol > aseton > metanol> su sırasında olduğu belirlendi. (Şekil 4.6)

4.4. ABTS $^{+}$ Radikal Katyon Yakalama Aktivitesi

Ortamdaki ABTS^{+} radikalleri meyve ekstresi ilavesinden sonra belli bir yüzdede yok edilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek ABTS^{+} radikali yok etme kapasitesi Şekil 4.9' de görüldüğü gibi meyve-aseton ekstresinde; en düşük sonuçlar ise meyve-su ekstresinde gözlenmiştir.



Şekil 4.11 Yaprak ekstraktlarının ABTS radikali giderme etkileri

Yaprak ekstraktlarının;

*su ekstraktlarının; %64,107, %42,994, %23,800, %21,113, %21,689,

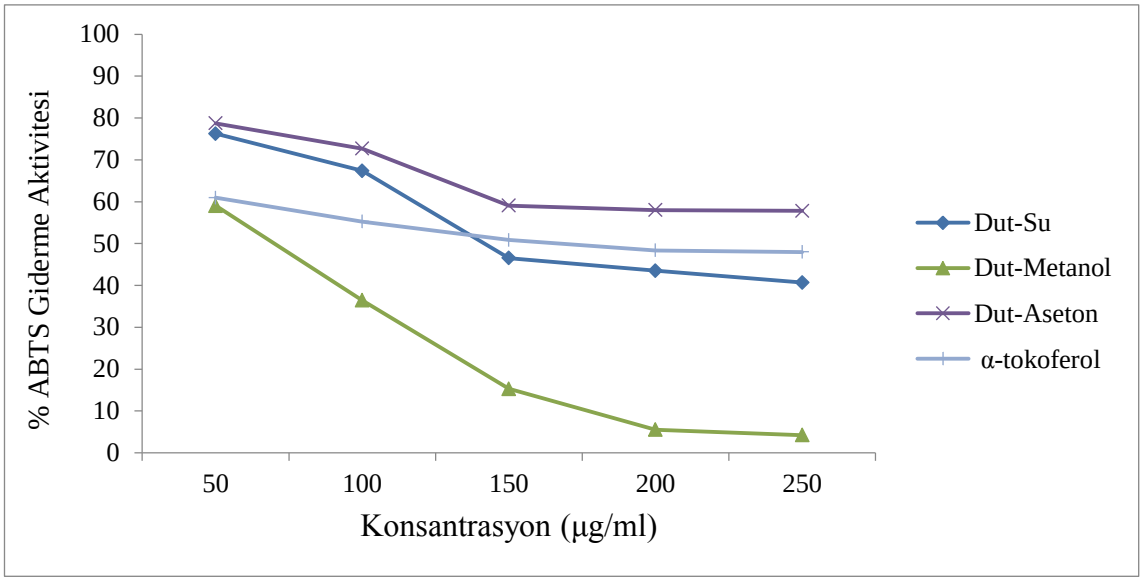
*aseton ekstraktlarının; %79,618, %73,795, %67,771, %63,755, %62,149,

*metanol ekstraktlarının; %72,314, %56,890, %36,662, %32,491, %30,341,

*α-tokoferolün; %60,960, %55,253, %50,843, %48,379, %47,990 ait % ABTS giderme aktivitesi değerlerine sahip oldukları görüldü.

250 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla;

Aseton > α-tokoferol > metanol> su sırasında olduğu belirlendi.



Şekil 4.12 Dut ekstraktlarının ABTS radikali giderme etkileri

Grafiğe göre Dut ekstraklarının;

*su ekstraktlarının; %76,247 %67,354, %46,529, %43,492, %40,672,

*aseton ekstraktlarının; %78,743, %72,670, %59,058, %58,010, %57,801

*metanol ekstraktlarının; %59,024, %36,423, %15,285, %5,528, %4,228

*α-tokoferolün; %60,960, %55,253, %50,843, %48,379, %47,990 ait % ABTS giderme aktivitesi değerlerine sahip oldukları görüldü.

250 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla;

Aseton > α-tokoferol > aseton > su > metanol sırasında olduğu belirlendi.

$ABTS^{+}$ radikali giderme aktivitesi sonuçları detaylı incelendiğinde; meyve ve yaprak ekstraktlarının bir kısmının standartın aynı konsantrasyonunda elde edilen radikal giderme aktivitesi sonuçlarıyla yakın değerde olduğu görüldü.

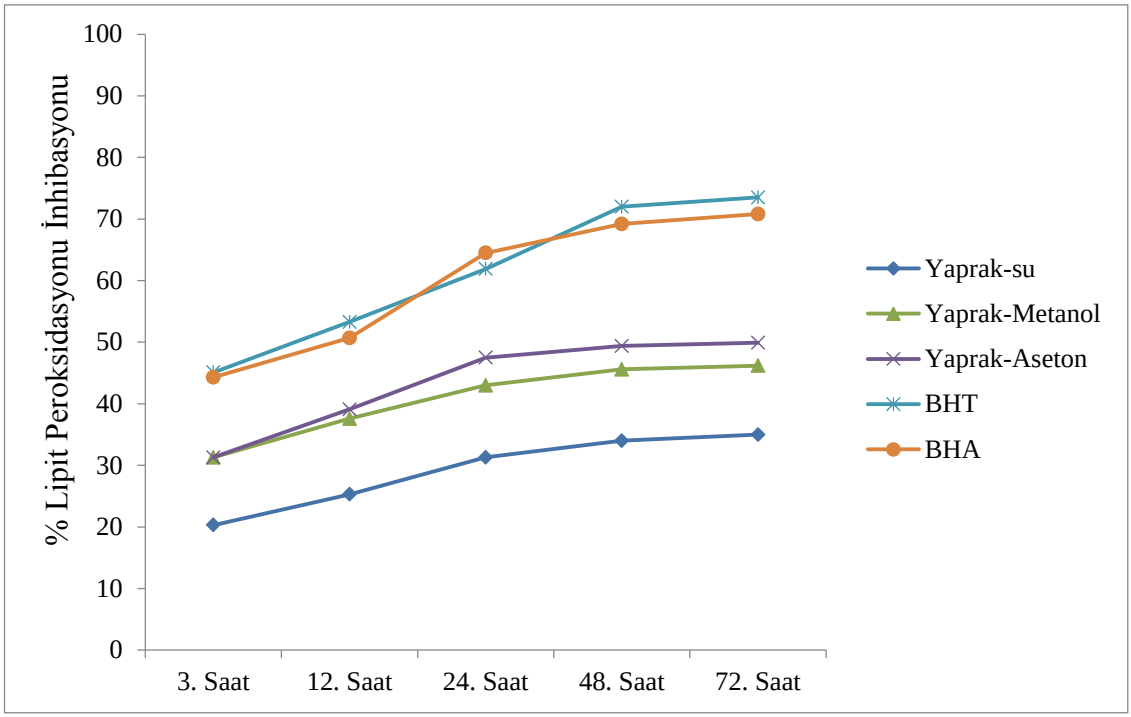
4.5. Linoleik Asit Emülsiyon Sistemi veya Demir tiyosiyanat Metodu

Ferrik tiyosiyanat metoduna göre; meyve-yaprak su, aseton ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri belirlendi. Bu sonuçlar ışığında BHA, BHT, α-tokoferol inhibisyon oranları ile kıyaslandı. Peroksitlerin miktarı, oksidasyonun 12 saatte bir ölçümü alınarak takip edildi.

Şahit absorbansının max olduğu herbir ekstrakt ve standart için grafikler çizildi. Grafiklerden yararlanarak peroksit oksidasyonuna karşılık gelen absorbansları okundu.

Tablo 4.6 Örneklerin çeşitli zamanlardaki linoleik asit peroksidasyon inhibisyon yüzdesi

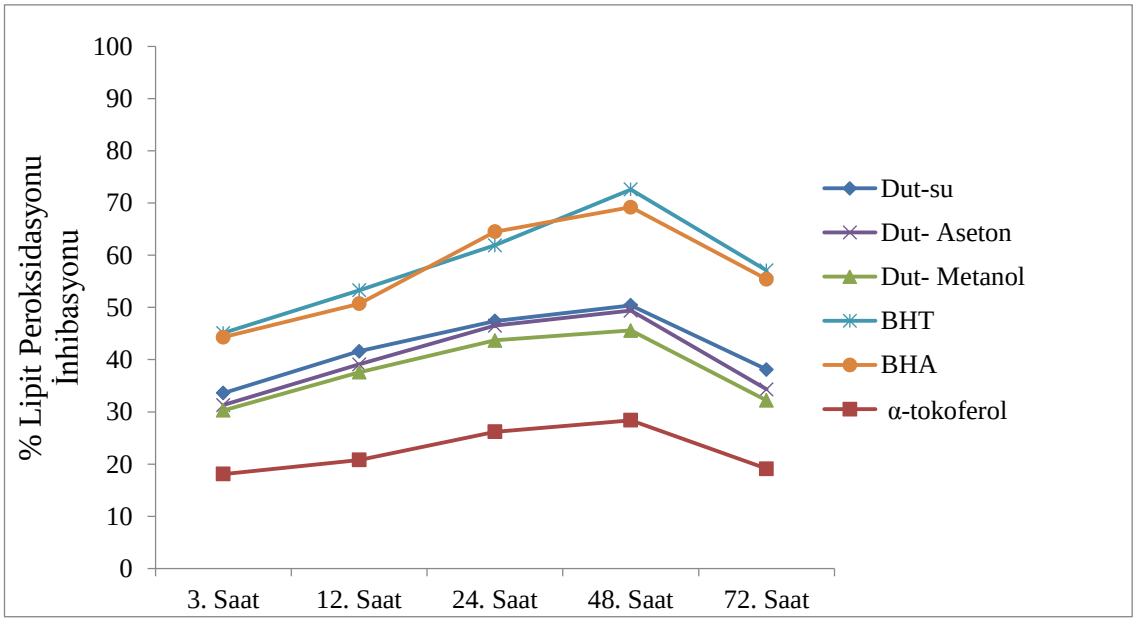
ÖRNEK	3. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Yaprak-su	23,4	37,6	41,6	44,3	35,1
Yaprak-metanol	20,3	25,3	31,3	34,3	21,4
Yaprak-aseton	34,3	44,2	48,9	53,1	24,8
Dut-su	33,6	41,6	47,4	50,4	38,1
Dut- metanol	30,3	37,6	43,7	45,6	32,2
Dut- aseton	31,3	39,1	46,5	49,4	34,3
Tokoferol	18,1	20,8	26,2	284	19,1
BHT	45,1	53,3	61,9	72,6	57,1
BHA	44,3	50,7	64,5	69,2	55,4



Şekil 4.13 Yaprak ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyon inhibisyonunun grafiksel olarak gösterimi

72 saatte yaprak ekstratının değerleri

* su %35,1	*metanol %24,8	*BHT %57,1
* aseton %21,7	*BHA, %55,4	*α-tokoferol %19,1



Şekil 4.14. Dut ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyon inhibisyonunun grafiksel olarak gösterimi

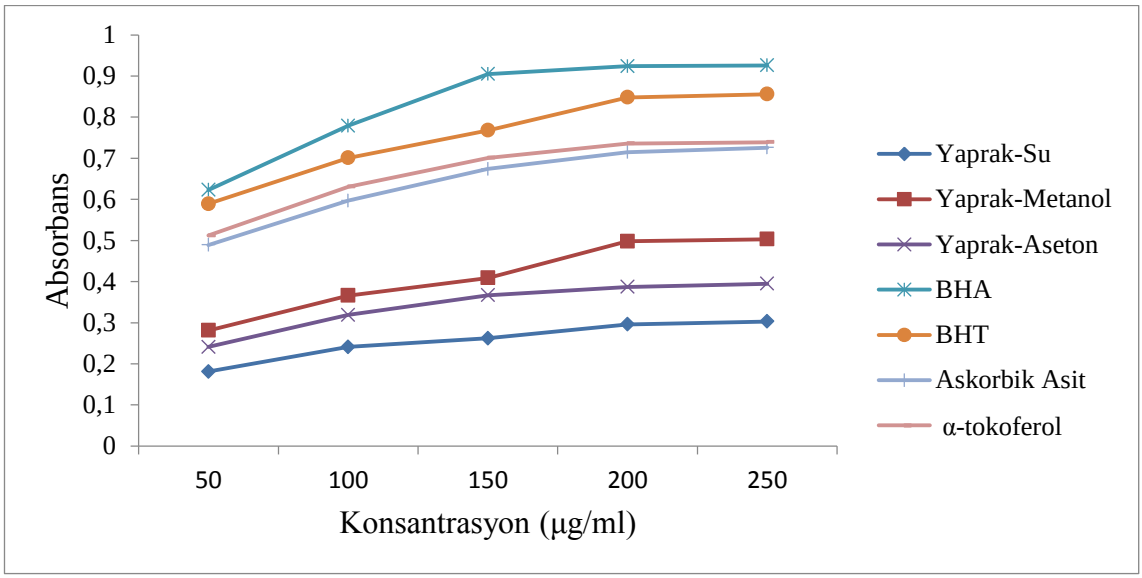
72 saatte dut ekstratının değerleri

* su %38,1,	*metanol %32,2	*BHT %57,1
* aseton %34,3	*BHA, %55,4	*α-tokoferol %19,1

4.6. İndirgeme Gücü Metodu

Yapılan analizin sonuçları askorbik asit için çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak askorbik asit standartına çevrilerek karşılaştırılmıştır. Şekil 4.15 askorbik asitin indirgeme gücünü göstermektedir.

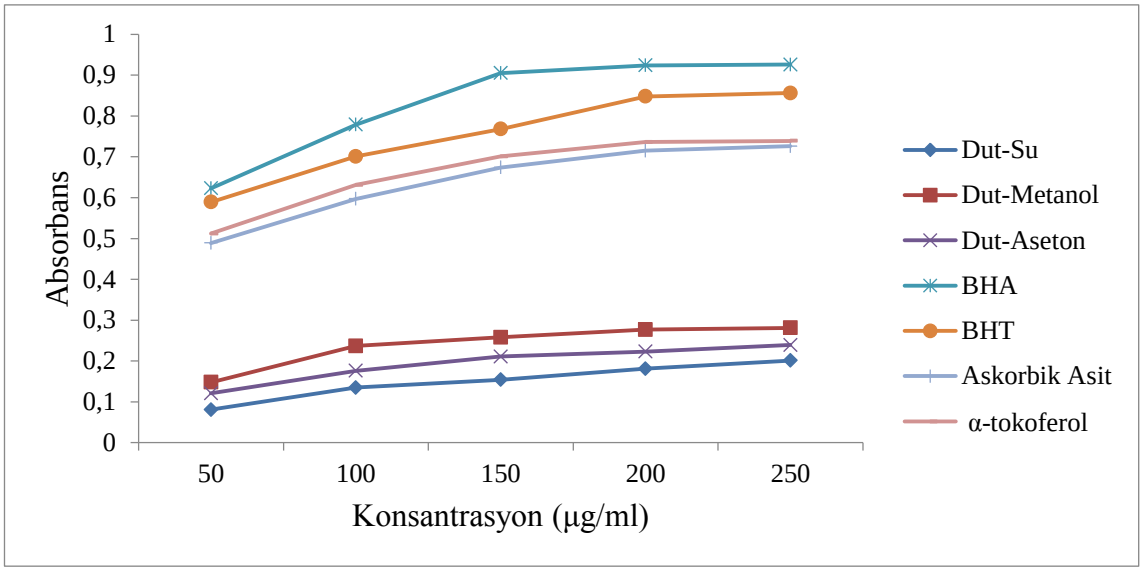
Derişim arttıkça antioksidan özellik gösteren maddelerin derişimi de yükseldiği için aktivitenin artması beklenilen bir durumdur. DPPH yönteminin aksine polarite ile indirgeme gücü kapasitesi arasında doğrudan bir ilişki gözükmemektedir.



Şekil 4.15 Yaprak ekstraktlarının indirgenme kapasitesi

Grafiğe göre;

BHA > BHT > α- tokoferol > A.asit > Yaprak Metanol > Yaprak Aseton > Yaprak Su sırasında azaldığı gözlendi.



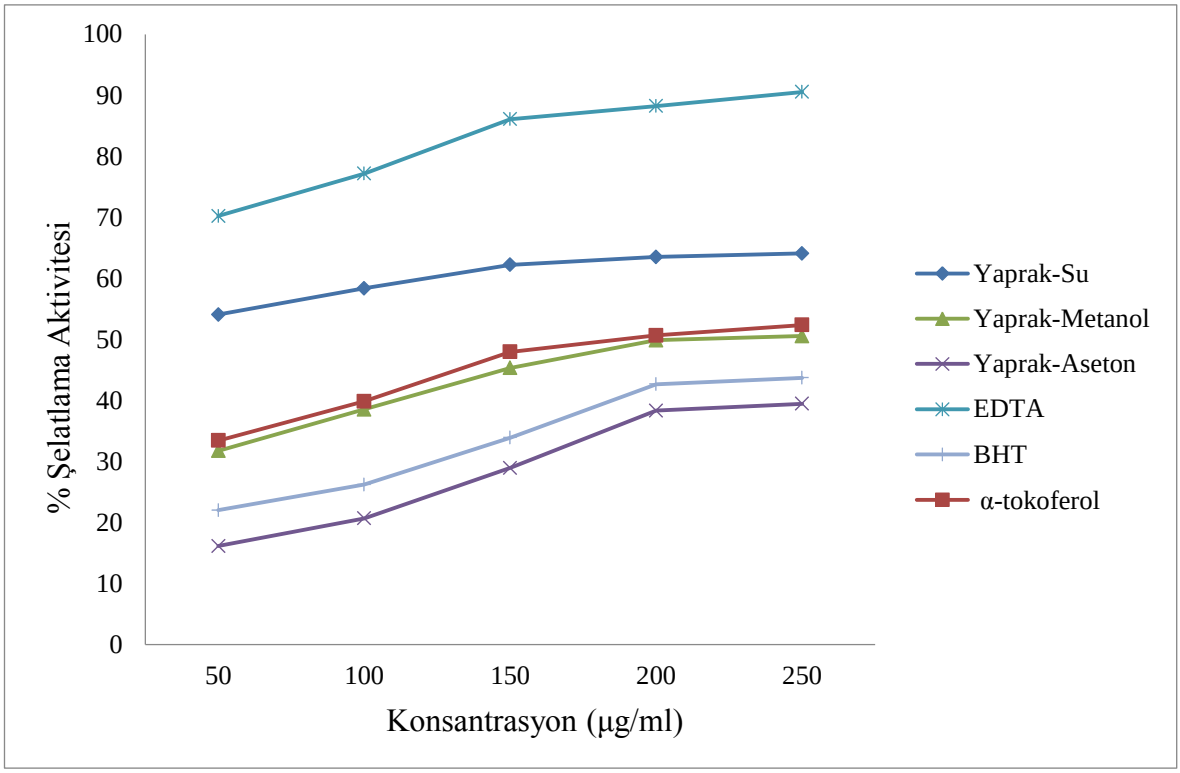
Şekil 4.16 Dut ekstraktlarının indirgenme kapasitesi

Grafiğe göre;

BHA>BHT>α-tokoferol>A.asit>Dut Metanol>Dut Aseton>Dut Su sırasında azalmaktadır.

4.7. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Deney sonucunda çözeltinin içerisinde bulunan Fe^{+2} iyonlarını bağlayabilme açısından meyve ve yaprak ekstraktlarının ferrozinin birbiriyle yarışmasına göre değerlendirildi. Deneylerde kullanılmak üzere standart çözelti olarak α-tokoferol, BHT, EDTA ve BHA tercih edildi.



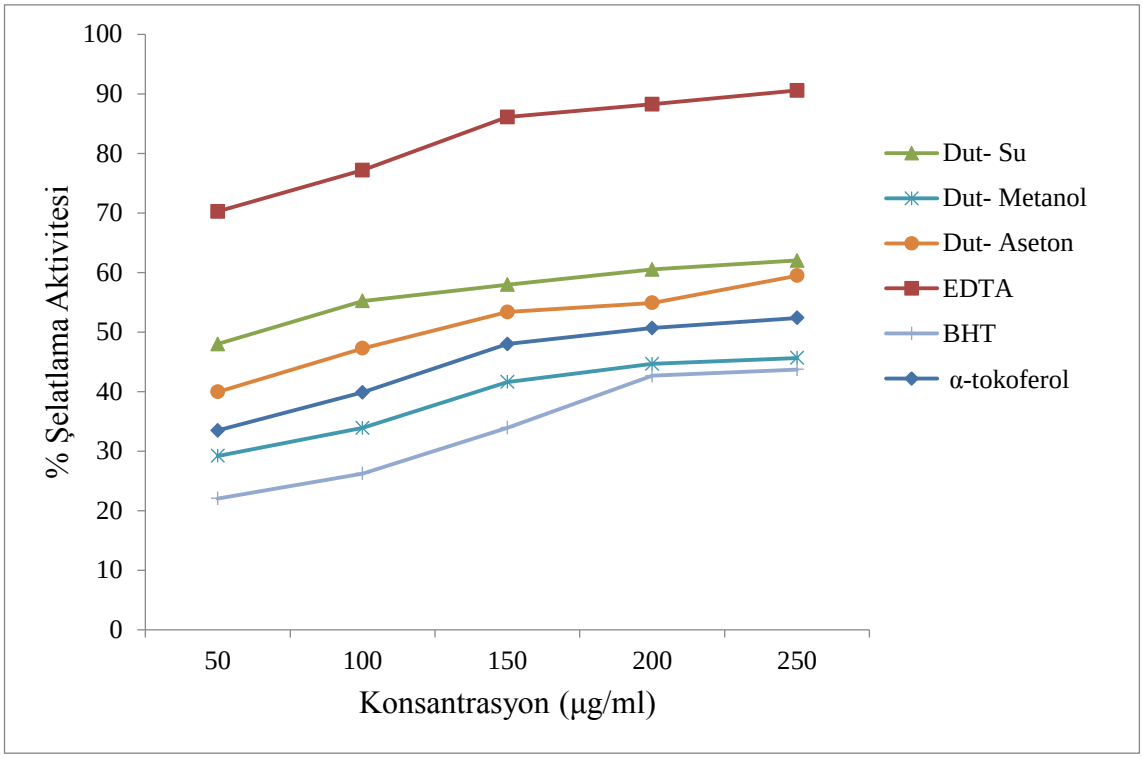
Şekil 4.17 Yaprak ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi

Grafiğe göre 100 µg/ml ekstrakların

* su %58,369

*aseton %20,677

*metanol 38,549 olarak şelatlama aktiviteleri belirlendi.



Şekil 4.18. Dut ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi

Grafiğe göre 100 µg/ml ekstrakların

* su %55,202

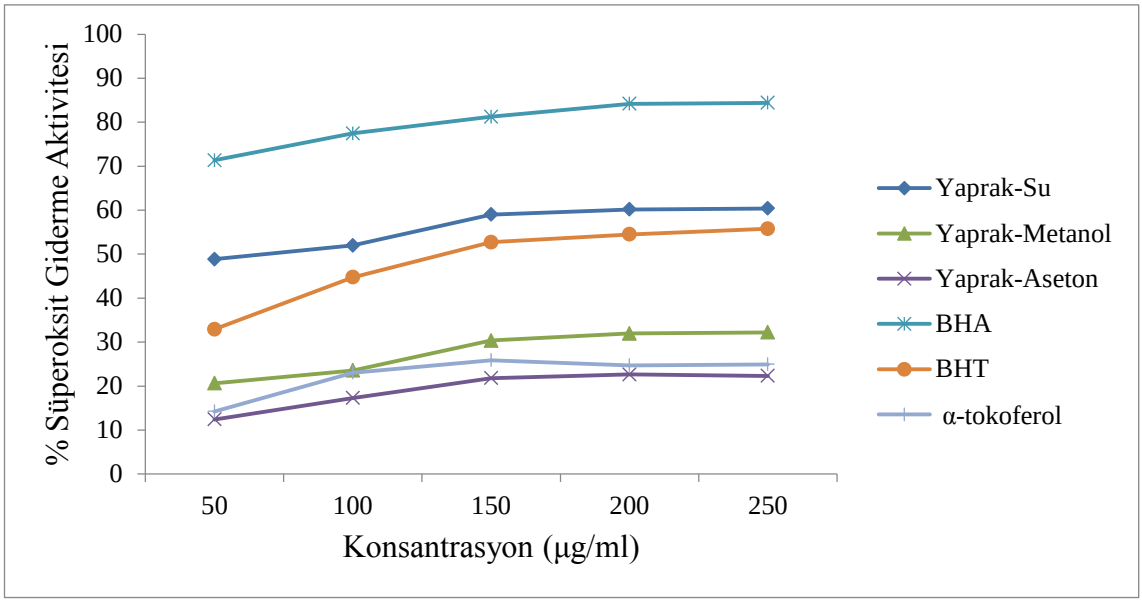
*aseton %47,256

*metanol 33,893 olarak şelatlama aktiviteleri belirlendi.

Grafiklerde görüldüğü gibi konsantrasyon arttıkça metal şelatlama yüzdesi artmaktadır.

4.8. Süperoksit radikali giderme

PMS/NADH/O_2 sisteminde ortam koşulları sağlanmasıyla süperoksit radikali oluşumu sağlandı. Bu oluşumla beraber beyaz dut meyve ve yaprak ekstraktlarının da süperoksit radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Deney sırasında BHA, BHT, tokoferol gibi çözeltiler kullanıldı. Meyve ve ekstraktlarının ve standart olarak kullanılan çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık süperoksit radikali giderme aktivitesi (%inhibisyon) grafiği çizildi.



Şekil 4.19 Yaprak ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi

Grafiğe göre yaprak ekstratının 100 µg/ml;

*su %51,97

*aseton %17,282

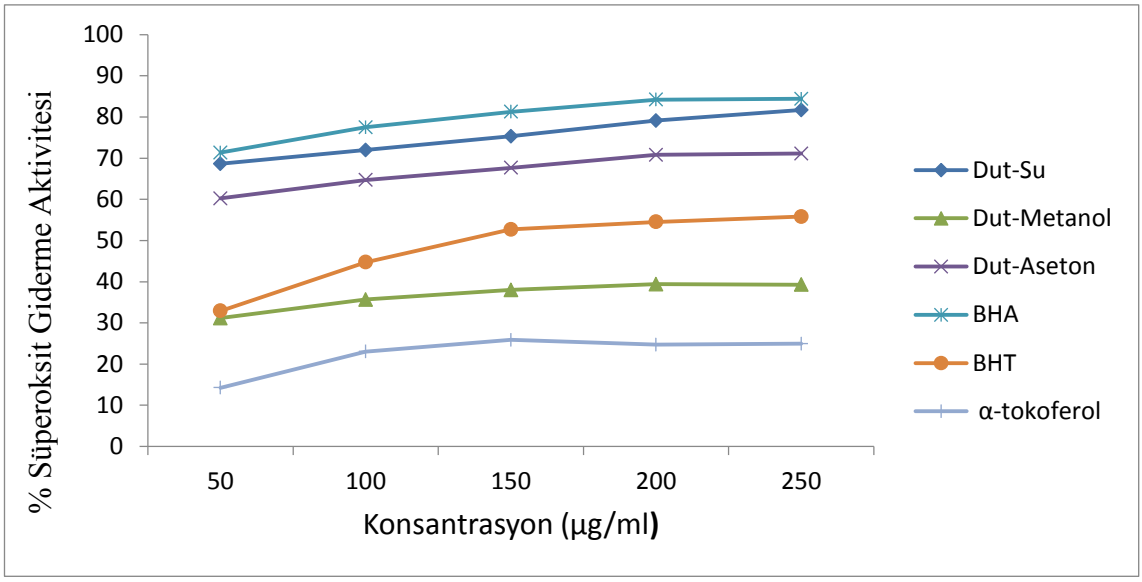
*metanol %23,569

*α-tokoferolun 23,040

*BHA %77,472

*BHT %44,730 oranlarında inhibisyon etkileri belirlendi.

BHA > Su > BHT > Metanol > α-tokoferol > aseton sırasında azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.20 Dut ekstraktlarının süperoksit radikali giderme aktivitesi

Grafiğe göre dut ekstratının 100 µg/ml;

*su %71,955

*aseton %64,700

*metanol %35,653

*α-tokoferolun 23,040

*BHA %77,472

*BHT %44,730 oranlarında inhibisyon etkileri belirlendi.

BHA > Su > Aseton > BHT > Metanol > α-tokoferol sırasında azaldığı belirlendi.

5.BÖLÜM

SONUÇLAR

Bir maddenin antioksidan özellik göstermesi birden fazla iç ve dış faktörlere göre değişmekte olup örneğin; sıcaklık, pH ve derişim gibi parametreler aynı maddenin farklı antioksidan değerleri bulunmaktadır. Tezin başında da belirtildiği üzere antioksidan maddelerin çok çeşitli etki mekanizmaları bulunmaktadır. Geçiş metal iyonu şelatlaması, radikalik yürüyen bir tepkimeyi durdurması ve peroksitlerin ayrıştırılması gibi verilen örnekleri çoğaltmak mümkündür. Antioksidanların birden fazla etki mekanizmaları bulunduğu için farklı metotlar analiz sırasında kullanılmıştır.

5.1. Toplam Fenolik Bileşik (TPC) Tayini:

Yapılan çalışmalar sonunda elde edilen verilerde her bir ekstrenin miktarındaki artış orantılı olarak antioksidan kapasitede miktarını da arttırdığı gözlenmiştir. Meydana gelen bu olayın tek sebebi meyvenin içerdiği antioksidan etkiye sahip fenolik bileşikler gibi birçok serbest gruplar da olabilir.

Karadutun toplam fenolik içeriği ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bae ve Suh (2007) Kore'deki 5 farklı dut çeşidinin toplam fenolik madde içeriğinin 959.9– 2570.4 µg GAE/g arasında değişim gösterdiğini bildirmektedir. Karadutun toplam fenolik içeriği 1422 mg GAE/100 g olarak bildirilmekteyken (Ercişli ve Orhan 2007) bir başka çalışmalarında aynı araştırmacılar tarafından (Ercişli ve Orhan 2008) 1943-2237 mg GAE/100 g arasında değişim gösterdiği aktarılmaktadır.

Özgen vd. (2009) ise karadutta toplam fenolik madde miktarının 1766–3488 µg GAE/g arasında, kırmızı dutta ise 1005–2388 µg GAE/g arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Karadut sularındaki toplam fenolik madde bulgularının diğer araştırma bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Diğer kırmızı renkli bazı meyve sularında fenolik madde miktarlarına ilişkin Piljac Zegarac vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada toplam fenolik madde değerleri Frenk üzüm suyu için 1309.6–1972.5 arasında, kızılcık suyu için 1452.7–1855.8 arasında, yabanmersini suyu için 1663.7–2145.8 arasında değiştiği belirlenmiştir.

5.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini;

Arabshahi-Delouee ve Urooj (2007), *Morus indica* (Çin dutu) yapraklarını metanol, aseton ve su ile ekstrakte ederek antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Metanolle hazırlanan ekstraktlar yüksek fenolik bileşik içeriğine bağlı olarak yüksek oranda antioksidan aktivite göstermiştir. Dut yapraklarının doğal bir antioksidan kaynağı olduğu belirtilmiştir. Yen vd (1996)'de, metanolle hazırlanan yaprak ekstraktlarının fenolik bileşik içeriği ve antioksidan aktivitelerinin diğer organik solventlerle hazırlananlara göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Zhishen vd (1999), dut yapraklarının flavonoid içeriklerini tespit etmişler, ilkbaharda alınan yapraklar için 11.7 ile 26.6 mg/g, sonbaharda alınanlar için ise 9.84-29.6 mg/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.[26] Araştırmacılar ekstraktların superoksit radikallerini temizleme etkilerini rutin ile karşılaştırmışlar, rutinden daha etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Bileşiklerin antioksidan aktiviteleri düşük olduğunda toplam antioksidan aktivite miktarının da düşük olması düşünülemez. Ekstrelerin içerisinde serbest geçiş maddelerin varlığı o maddenin antioksidan aktivite değerini etkileyebilir. Bu sebeple; antioksidan aktivitesi düşük olan maddelerin içerdikleri fenolik bileşik miktarı ve indirgeme kuvveti yüksektir.

5.3. Toplam Ferrik İyonlarını (Fe+3) İndirgeme Kapasitesinin Tayini:

Yaprak su ekstraktının aseton ve metanol ekstraktlarından, meyve metanol ekstraktının da su ve aseton ekstraktlarından daha fazla indirgeme kapasitesi gösterdikleri bulunmuştur. Ekstraktları Fe^{3+}'ü indirgeyebilmektedir. Fakat standart antioksidan olan BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferole karşılaştırıldığında daha düşük indirgeme gücüne sahip oldukları bulundu. (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16)

İndirgeme kuvvetlerinin sıralanışı;

Yaprak metanol > yaprak aseton > yaprak su > dut metanol > dut aseton > dut su şeklindedir. Bu sıralama; beyaz dut meyvelerindeki indirgeyici bileşiklerinden kaynaklanmış olabilir.

5.4. Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini:

Çalışma sırasında meyve ve yaprak ekstrelerin Fe^{+2} iyonu şelatlama aktiviteleri incelenmiştir. Bu incelemelerde indirgeme kuvveti ile metal şelatlama aktivitelerinin birbirinden tamamen farklı olduğu bulunmuştur. Aralarındaki bu fark birisinde metal iyonları tutuklanırken, diğerinde ise indirgeme söz konusudur.

Metal şelatlama sıralaması ise;

EDTA >yaprak su > dut su > dut aseton > α-tokoferol > yaprak metanol > dut metanol > BHT > yaprak aseton şeklinde artmaktadır.

Fenolik bileşiklerin, şelatlama özelliklerinin daha iyi olması yapısında (-OH, -SH, -COOH, -PO3H2, C=O, -NR2, -S ve - O-) fonksiyonel grupların bulunduğu görülmüştür.[24] Bu nedenle örneklerin şelatlama aktivitesindeki farklılık, fenolik madde miktarlarının farklı olmasının yanısıra, farklı yapı ve pozisyonlardaki fenolik madde gruplarına sahip olmaları ile açıklanabilmektedir.

5.5. DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini:

Birçok biyomolekül için ortamda bulunan serbest radikallerin yok edilmesi çok önemlidir. Zincir reaksiyonların başlamasında ve ilerlemesinde görevleri bulunmaktadır. Oluşabilecek bir sorun durumunda biyomoleküllerin stabilitesi bozulmakta[23] birçok hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Çalışmalarımızda DPPH• ve $ABTS•^{+}$serbest radikalinden yararlanılmıştır.

DPPH giderme aktivitesine sıralaması ise:

α-tokoferol> yaprak metanol > yaprak su > dut -metanol > yaprak aseton > dut - aseton > dut - su şeklindedir.

Kwon vd (2005), dut suyu ve posasının metanol ve su ekstraktlarının radikalleri temizleme etkisini karşılaştırmışlar, dut posasının metanol ekstraktının DPPH radikaline (IC50=167.45 µg/ml), süperoksit radikaline (IC50=36.18 µg/ml) ve hidroksil radikaline (IC50=467.08 µg/ml) karşı en güçlü radikal temizleyici etkiyi gösterdiğini tespit

etmişlerdir. Metanol ekstraktı gibi dut posasının su ekstraktı da, dut suyu ekstraktlarına göre daha güçlü etki göstermiştir. Araştırma sonucunda, dut posası ekstraktlarının radikalleri engelleyici olarak doğal antioksidan kaynağı gibi kullanılabileceği vurgulanmıştır.

5.6. Süperoksit Anyon Radikalini Giderme Aktivitesinin Tayini:

Lipit peroksidasyonuna süperoksit anyon radikalleri sebep olmaktadır. Oluşan bu radikaller doku hasarlarına da sebep olurlar.[23] Tez kapsamında yapılan çalışmalarda meyve-yaprak ekstrelerden en yüksek aktivitesinin su ekstrelerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte tüm ekstraktların aktivite değeri olan α-tokoferol'den yüksektir. Ekstrelerin içerisinde en yüksek süperoksit giderme aktivitesine sahip olma sıralaması ise

BHA> dut su > dut aseton > yaprak su > BHT> dut metanol > yaprak metanol > α-tokoferol>yaprak aseton şeklindedir.

5.7. $ABTS^+$ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini:

$ABTS^+$ radikali, antioksidan maddeler ile kimyasal tepkimeye girmektedir. Daha sonra elektron kaybederek radikal olmayan ABTS•+ maddesine dönüşmektedir. Dalga boyundaki absorbans azalmasından yararlanarak antioksidan aktivitesi hesaplanmıştır.

ABTS giderme aktivitesinin sıralaması ise;

Dut metanol > yaprak su > yaprak metanol > meyve su > meyve aseton > yaprak aseton şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde mevcut diğer çalışmalar incelendiğinde ise, Fang vd. (2009) ticari böğürtlen sularının antioksidan aktivitesinin ABTS yöntemine göre 769 – 2174 TEAC mg/L arasında olduğunu aktarmaktadırlar. Garcia-Alonso vd. (2004) farklı meyvelerde antioksidan aktivitenin ABTS yöntemine göre böğürtlende 192 μmol/g, yabanmersininde 187 μmol/g, çilekte ise 163 μmol/g olduğunu bildirilmektedir.

5.8. Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu:

Çalışılan bütün ekstrelerin sıralaması aşağıda belirtildiği üzere standart bir antioksidan olan α-tokoferol'den çok yüksek aktivite göstermektedir. Ayrıca meyve ve

yaprak ekstrelerin peroksidasyonu inhibe etme yüzdelerinin BHA ve BHT'ye yakın olduğu belirlenmiştir.

Sıralama ise;

BHT> BHA> yaprak metanol > dut -su > dut-aseton > dut- metanol > yaprak-su > yaprak-aseton >α-tokoferol şeklinde olduğu tespit edildi.

Eruçar'ın (2006) yaptığı ise, böğürtlen yaprağı metanol-su (%80) ekstraktlarının linoleik asit peroksidasyonunu %86.64 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.[28]

Tüm antioksidan aktivitesi analizi sonuçları incelendiğinde analiz örneklerinin her bir yöntem için yüksek antioksidan aktivitesi sıralamasında da farklılıklar olabilir. Bundan dolayı tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında kesin bir karar verilmemektedir. Her bir antioksidanın farklı radikallere karşı çeşitli reaksiyon mekanizmasına sahip olabileceği bilinen bir gerçektir.

Birkaç yeni çalışmada dut yapraklarının antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Bu araştırmalar neticesinde dut yapraklarından izole edilen izokuersitrinin DPPH radikalini temizlediği, insan ve tavşan LDL'sinin oksidatif modifikasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Dut yapraklarında izole edilen pirenilflavonlarında kuersetinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.[27]

Bitkisel kaynaklı ilaçların bu önemli etkilerinden dolayı çalışmada; beyaz dut meyve ve yaprakların su, aseton ve metanol ekstrelerinin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Laboratuvar ortamın çeşitli antioksidan sistemlerde dutun su ve etanol ekstrelerinin güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu bu çalışmanın sonucunda bulunmuştur.

6.BÖLÜM

KAYNAKLAR

[1] Akkuş, İ., ***SR'ler ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları***, Konya, (1995).

[2] Alasalvar, C., Farsi, M.A., Quantick, P.C., Shahidi, F., Wiktorowicz, R., ***Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots***, Food Chemistry, 89, 69–76, (2005).

[3] Altınışık, M., ***Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar***, Adü Tıp Fakültesi Biyokimya AD., Aydın, (2000).

[4] Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., ***Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves***, Food Chemistry, 102, 1233-1240, (2006).

[5] Arnon, D.I., ***Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in Beta vulgaris***, Plant Physiology, 24, 1-15, (1949).

[6] Arora, A., Nair, M.G. and Strasburg, G.M., ***Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system***, Free Radical Biology and Medicine, 24, 1355-1363, (1988).

[7] Ateş, D. A., ve Erdoğrul, Ö. T., ***Antimicrobial activites of various medicinal and commercial plant extracts***, Türk. J. Biol., 27, 157-162, (2003).

[8] Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., ***Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (Sorghum bicolor) and Sorghum product***, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6657-6662, (2003).

[9] Baytop, T., ***Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte ve Bugün)***, Nobel Tıp kitapevleri, İstanbul, pp. 357-358, (1999).

[10] Bates, S.L., ***Rapid determination of free proline for water stres studies***, Plant Soil, 39, 205-207, (1973).

[11] Becker, E.M., Nissen, L.S., Skibsted, L.H., ***Antioxidant evaluation protocols:***

Food quality or health effects, European Food Research and Techonology, 10.107/s00217-004-1012-4, (2004).

[12] Benzie, I.F.F., Strain, J.J., ***The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay***, Analytical Biochemistry, 239, 70-76, (1996).

[13] Bercu, V., Negut, C.D., Duliu, O.G., ***EPR studies of the free radical kinetics in γ-rays, irradiated Pleurotus ostreatus oyster mushrooms***, Food Res Int., 44, 139–145, (2011).

[14] Blois, M.S., ***Antioxidant determinations by the use of stable free radical***, Nature, 1199-1200. (1958).

[15] Bozdemir, Y., ***Keten tohumu (Linum Usitatissimum)ekstraktında katalaz ve süperoksit düsmutaz enzim aktiviteleri***, Y. Lisans Tez, Kimya Anabilim Dalı, Adana, (2007).

[16] Cam, M., Hışıl, Y., ***Gıdalardaki flavonoidler ve önemleri***, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim, s. 67-82, (2003).

[17] Cheesman, K.H., Slater, T.F., ***An introduction to free radical biochemistry***, British Medical Bulltin, 49 (3), 481-493, (1993).

[18] Chen, H.Y., Yen, G.C., ***Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (Psidium guajava L.) leaves***, Food Chemistry, 101, 686-694, (2007).

[19] Choe, E., Min, D.B., ***Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods***, J Food Sci, 70, 142-158, (2005).

[20] Cook, J.A., Vanderjagt, D.J., Pastuszyn, A., Mankaila, G., Glew, R.S., Milbon, M. and Glew, R.H., ***Nutrient and chemical composition of 13 wild plant foods of niger***", Journal of Food Composition and Analysis, 13, 83-92, (2000).

[21] Dasguptan, DE B., ***Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study***, Food Chemistry, 101, 471-474, (2007).

[22] Dean, R.R., Cheeseman, K.H., ***Restriction of free radical attack an monoamine oxidases in mitochondrial membrane by vitamin E***, Biochem Biophys Res Commun, 148, 1277-1282, (1987).

[23] Deng, J., Cheng, W., Yang, G., ***A novel antioxidant activity index (AAV) for natural products using the DPPH assay***, Food Chemistry, 125, 1430-1435, (2011).

[24] Diplock, A., ***Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients,*** ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium, (1998).

[25] El, S.N. and Karakaya, S., ***Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet***, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 55, 67-74, (2004).

[26] Emecen, Ö., ***Astımlı hastalarda serum total oksidan/antioksidan status ve ECP düzeylerinin değerlendirilmesi***, Uzmanlık tezi, İstanbul, (2009).

[27] Erbaş, M., Şekerci, H., ***SR'lerin önemi ve gıda işleme sırasında oluşumu***, Gıda, 36(6), 349-356, (2011).

[28] Eruçar, S., ***Bazı Bitkisel Çayların Fenolik Madde Profili ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi***, Y.Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2006).

[29] Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentao, P., Andrade, P., ***Vitis vinifera leaves towards bioactivity***, Industrial Crops and Products, 43, 434-440, (2012).

[30] Freman, B.A., Crapo, J.D., ***Biology of disease, free radicals and tissue injury***, Laboratory Investigation, 47(5), 412, (1982).

[31] Fridovich, I., ***Superoxide Radical and Superoxide Dismutase***, Biochem. Soc. Trans., 1, 48, (1973).

[32] Garrido, G., Gonzalez, D., Romay, C., Nunez-Selles, AJ., Delgado, R., ***Scavenger effect of a mango (Mangifera indica L.) food supplement's active ingredient on free radicals produced by human polymorphonuclear cells and hypoxanthine–xanthine oxidase chemiluminescence systems***, Food Chem., 107, 1008-1014, (2008).

[33] Guerrero-Romero, F., Rodrı´guez-Mora´na, M., ***Complementary Therapies for Diabetes: The Case for Chromium, Magnesium, and Antioxidants***, Archives of Medical Research, 36, 250-257, (2005).

[34] Gülçin, İ., ***The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (Piper nigrum) seeds***, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56(7), 491-499, (2005).

[35] Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., ***Antioxidant activity of lignans from fringe tree (Chionanthus virginicus L.)***, European Food Research and Technology, 223, 759-767, (2006).

[36] Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M. and Büyükokuroglu, M.E., ***In***

vitro antioxidant properties of morphine, Pharmacol Res., 49, 59-66, (2004).
[37] Gülçin, İ., Alici, H.A. and Cesur, M., ***Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol***, Chem. Pharm. Bull., 53(3), 281-285, (2005a).
[38] Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., ***The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species***, In: Free Radicals in Biology and Medicine, New York: Oxford University Press, p. 20-64, (1985).
[39] Halliwell, B., ***The wanderings of a free radical***, Free Radical Bio Med, 46, 531-542, (2009).
[40] Halliwell, B., Gutterridge, J.M., ***Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts***, Arch Biochem Biophys, 246, 501-514, (1986).
[41] Hare, P.D. and Cress, W.A., ***Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants, Plant Growth Regulation***, 21, 79-102, (1997).
[42] Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., ***Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methyglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells***, J. Plant Physiol, 165, 813-824, (2008).
[43] Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., ***The chemistry behind antioxidant capacity assays, Reviews, Journal of Agricultural Food Chemistry***, 53, 1841-1856, (2005).
[44] Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervi, B., Williamson, G., ***Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2***, Biochem. Soc.Trans., 25, S-559, (1997).
[45] Ilçım, A., Dığrak, M., Bağcı, E., ***Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması***, Türk. J. Biol., 22, 119-125, (1998).
[46] Inglet, G. E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S., ***Antioxidant activity of commercial buck wheat flours and their free and bound phenolic compositions***, Food Chemistry, 125, 923-929, (2011).
[47] Kılınç, K., Kılınç, A., ***Oksijen toksisitesinin aracı molekulleri olarak oksijen radikalleri***, Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2), 110-118, (2002).
[48] Köksal, E., ***Karnabahar (Brassica oleracea L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi***, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2007).

[49 Kumar, S., Free ***radicals and antioxidants***: Human and food system, Adv Appl Sci Res., 2, 129-135, (2011).

[50] Larson, R.A., ***The antioxidants of higher plants***, Phytochemistry, 27(4), 969-978, (1988).

[51] Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwami, K., ***Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid***, Eiyoto Shokuryo, 19, 210-214, (1966).

[52] Nakiboğlu, M., Urek R.O., Kayalı, HA., Tarhan, L., ***Antioxidant capacities of endemic Sideritis sipylea and Origanım sipyleum from Turkey***, Food Chemistry, 104, 630-635, (2007).

[53] Ningappa, M.B., Dinesha, R., Srinivas, L., ***Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (Murraya koenigii L.) extracts***, Food Chemistry, 106, 720-728, (2008).

[54] Nishimiki, M., Rao, N.A., Yagi, K., ***The occurance of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen***, Biochemical and Biophysical Research Communications, 46(2), 849-854, (1972).

[55] Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D.D., Ergun, F., ***Yeşilada, E., In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (Vitis vinifera) in diabetic rats***, Journal of Ethnopharmacology, 108, 280-286, (2006).

[56] Oyaizu, M., ***Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine***, Japan Journal of Nutrition, 44, 307-315, (1986).

[57] Özcan, M.M., Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., ***Türkiye'de ticari açıdan önemli Lamiaceae familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi***, TÜBİTAK Projesi, No:TOGTAG-3319, Konya, (2007)

[58] Özçelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., ***Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants***, Journal of Food Science, 68, 487–490, (2003).

[59] Pan, Y., Zhang, X., Wang, H., Liang, Y., Zhu, J., Li, H., Zhang, Z., Wu, Q., ***Antioxidant potential of ethanolic extract of Polygonum cuspidatum and application in peanut oil***, Food Chemistry, 105(4), 1518-1524, (2007).

[60] Pari, L., Suresh, A., ***Effect of grape (Vitis vinifera L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats***, Food and Chemical Toxicology, 46, 1627-1634,

(2008).

[61] Percival, M., ***Antioxidants***, Clinical Nutrition Insıghts, 10, 1-4, (1998).

[62] Pietta, P.G., ***Flavonoids as antioxidants***, Journal of Natural Products, 63, 1035–1042, (2000).

[63] Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., Jiang, Y., ***Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species***, İnnovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 627-632, (2009).

[64] Prieto, P., Ineda, M., & Aguilar, M., ***Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E***, Analytical Biochemistry, 269, 337-341, (1999).

[65] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., ***Antioxidants activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay***, Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237, (1999).

[66] Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., ***Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular comunication by antioxidant catechins isolated from Chinese grean tea***, Carcinogenesis, 10(6), 1003-1008, (1989).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuğçe KÜÇÜKYILDIRIM

Doğum Yeri Yılı: Edirne – 1990

Eğitim Bilgileri:

2004-2008 Edirne Anadolu Lisesi

2009- 2013 Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Aydın

2009- 2014 Anadolu Üniversitesi, İşletme Fakültesi, İşletme Bölümü – Eskişehir

Adres: Kocasinan mah. Sadık Ahmet çalışkan cad. binevler sül sitesi , 22030

Telefon: +90 544 78 137 78

E-Posta: tugcekyildirim@gmail.com