

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİNİN ZEYTİN  
YAPRAĞINDAKİ FENOLİK MADDE DAĞILIMINA VE  
ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERPİL KARA

BALIKESİR, KASIM - 2013

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİNİN ZEYTİN  
YAPRAĞINDAKİ FENOLİK MADDE DAĞILIMINA VE  
ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SERPİL KARA**

**BALIKESİR, KASIM - 2013**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Serpil KARA tarafından hazırlanan "FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİNİN ZEYTİN YAPRAĞINDAKİ FENOLİK MADDE DAĞILIMINA VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 22.11.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Serap DOĞAN

Üye  
Doç. Dr. Reyhan İRKİN

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Komisyonu tarafından 2012/88 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### FARKLI KURUTMA YÖNTEMLERİNİN ZEYTİN YAPRAĞINDAKİ FENOLİK MADDE DAĞILIMINA VE ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SERPİL KARA  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, KASIM - 2013

Bu çalışmada zeytin yaprağının fenolik bileşenlerine ve antioksidan kapasitesine farklı kurutma yöntemlerinin etkisi araştırılmıştır. Ayvalık (1) ve Gemlik (2) çeşitlerine ait yapraklar, oda (N), konveksiyonel (K), infrared (İ) ve mikrodalga (M) şartlarında kurutulmuştur. Antioksidan aktivite tayini için DPPH, toplam fenolik madde tayini için Folin-Ciocalteu ve fenolik madde dağılımı için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada örneklerin antioksidan aktivitelerinin % 82.76 (1N)-% 93.42 (2M), toplam fenolik madde miktarlarının ise 165.18 mg/100 g (2İ)-409.88 mg/100 g (2M) arasında değiştiği saptanmıştır. Çalışmada teşhis edilen başlıca fenolik bileşenler; oleuropein, lüteolin 7-glukozid, tirozol, kafeik asit, rutin hidrat ve kuersetin'dir. Bütün örneklerdeki hakim fenolik bileşenin oleuropein (7233 µg/100 gr (1İ)-17698 µg/100 gr (2M)), örneklerin genelinde en zayıf bileşenin ise kuersetin (3 µg/100 gr (2K)-13 µg/100 gr (1A)) olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlara göre en fazla mikrodalga ile kurutma yönteminde fenolik maddelerin açığa çıktığı ve kurutulan zeytin yapraklarının antioksidan aktivitesinde yüksek olduğu belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** zeytinyaprağı, kurutma yöntemleri, fenolik madde, antioksidan aktivite, HPLC

## ABSTRACT

### RESEARCH OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLIVE LEAFS BY DIFFERENT DRYING METHODS

MSC THESIS  
SERPIL KARA

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, NOVEMBER 2013

In this study, the effect of different drying methods of olive leaves onto antioxidant activity and phenolic compounds was investigated. Leaves of the Ayvalık (1) and Gemlik (2) varieties were dried at room temperatures (N), convectional (K), infrared (I), and microwave (M) conditions. For the determination of antioxidant activity, total phenolic content and the distribution of phenolic compounds, DPPH, Folin-Ciocalteu and HPLC methods were used, respectively. In this study, it was determined that the antioxidant activity of the samples ranged between 82.76 % (1N)- 93.42 % (2M) while the amount of total phenolic compounds ranged between 165.18 mg/100 g (2I) and 409.88 mg/100 g (2M). The main phenolic compounds identified by this study were oleuropein, luteolin 7-glucoside, tyrosol, caffeic acid, rutin hydrate, and quercetin. The dominant phenolic compounds in all the samples was oleuropein [7233 µg/100 gr (1I)-17698 µg/100 gr (2M)] and least component found in samples in general, was quercetin [3 µg/100 gr (2K)-13 µg/100 gr (1A)]. The greatest amount of phenolic compounds was released by microwave drying method and the high antioxidant activity of dried olive leaves were defined.

**KEYWORDS:** oliveleaf, phenolic, antioxidant activity, HPLC

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Serbest Radikaller.....	1
1.2 Antioksidan Aktivite .....	3
1.3 Fenolik Bileşikler .....	4
1.4 Zeytin Yaprağı ve Zeytin Yaprağındaki Fenolik Bileşikler .....	8
1.4.1 Oleuropein .....	11
1.4.2 Lüteolin 7-glukozid.....	12
1.4.3 Tirozol.....	13
1.4.4 Kafeik Asit.....	14
1.4.5 Vanilik Asit.....	15
1.4.6 Rutin.....	16
1.4.7 Kuersetin.....	17
1.5 Amaç ve Kapsam.....	19
1.6 Literatür Özeti .....	20
<b>2. MATERYAL ve METOT.....</b>	<b>22</b>
2.1 Materyal.....	22
2.2 Metot .....	23
2.2.1 % Nem Tayini.....	23
2.2.2 Kurutma ve EkstraktEldesi .....	23
2.2.3 Folin- Ciocalteu Fenol Reaktifi Çözeltisi Hazırlanması.....	23
2.2.4 Gallik Asit Stok Çözeltisinin Hazırlanması.....	24
2.2.5 Sodyum Karbonat Çözeltisinin Hazırlanması .....	24
2.2.6 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) Reaktifinin Hazırlanması.....	24

2.3 Toplam Fenolik Madde Analizi .....	24
2.3.1 GallikAsit Standart Eğrisinin Hazırlanması .....	25
2.4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini .....	25
2.5 HPLC ile Fenolik Madde Dağılımı Analizi.....	27
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
3.1 Yaprak Örneklerinin Kuru Madde Oranlarına İlişkin Bulgular .....	28
3.2 Toplam Antioksidan Aktivite Analizine İlişkin Bulgular .....	28
3.3 Toplam Fenolik Madde Analizine İlişkin Bulgular.....	28
3.4 Fenolik Madde Dağılımı Analizine İlişkin Bulgular .....	29
<b>4. SONUÇ TARTIŞMA.....</b>	<b>36</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>42</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>44</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1: Basit fenol yapısı.....	5
Şekil 1. 2: Zeytin yaprağı .....	9
Şekil 1. 3: Oleuropeinin kimyasal yapı formülü.....	12
Şekil 1. 4: Luteolin-7-glukozidin kimyasal yapı formülü.....	13
Şekil 1. 5: Tirazolün kimyasal yapı formülü .....	14
Şekil 1. 6: Kafeik asitin kimyasal yapı formülü .....	15
Şekil 1. 7: Vanilik asitin kimyasal yapı formülü .....	16
Şekil 1. 8: Rutinin kimyasal yapı formülü.....	17
Şekil 1. 9: Kuersetinin kimyasal yapı formülü .....	18
Şekil 2. 1: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı.....	26
Şekil 2. 2: DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu.....	26
Şekil 3. 1: Zeytin yapraklarının toplam fenol içeriğinin hesaplanmasında .....	29
Şekil 3. 2: Oleuropeinin standart HPLC piki (3.30 dk.).....	30
Şekil 3. 3: Luteolin-7 glikozitin standart HPLC piki (3.81 dk.).....	31
Şekil 3. 4: Tirozolün standart HPLC piki (3.32 dk.) .....	31
Şekil 3. 5: Kafeik asitin standart HPLC piki (2.32 dk.).....	31
Şekil 3. 6: Vanilik asidin standart HPLC piki (4.78 dk.).....	32
Şekil 3. 7: Rutin hidratin standart HPLC piki (4.08 dk.).....	32
Şekil 3. 8: Kuersetinin standart HPLC piki (8.43 dk.).....	33
Şekil 3. 9: Oleuropein piki.....	33
Şekil 3. 10: Kafeik asit piki .....	34
Şekil 3. 11: Tirozol piki .....	34
Şekil 3. 12: Rutin hidrat piki .....	35

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1. 1:</b> Canlı organizmalardaki önemli ROT çeşitleri .....	2
<b>Tablo 1. 2:</b> Bazı serbest radikal kaynakları .....	3
<b>Tablo 1. 3:</b> Fenolik ve polifenolik bileşiklerin temel yapısı .....	5
<b>Tablo 2. 1:</b> Numunelere ait kodlar.....	22
<b>Tablo 2. 2:</b> HPLC şartları .....	27
<b>Tablo 3. 1:</b> Kuru Madde Oranları (%).....	28
<b>Tablo 3. 2:</b> Antioksidan Aktivite (%).....	28
<b>Tablo 3. 3:</b> Toplam Fenolik Madde (mg/100g).....	29
<b>Tablo 3. 4:</b> Fenolik Madde Dağılımı (mg/100gr).....	30

## SEMBOL LİSTESİ

<b>AAPH</b>	:	2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorit
<b>DPPH</b>	:	Difenil-1-pikrilhidrazil
<b>DNA:</b>		Deoksiribonükleik asit
<b>Fe:</b>		Demir
<b>HPLC</b>	:	Yüksek performans sıvı kromatografisi
<b>IR:</b>		Infrared
<b>pH:</b>		Asitlik veya bazlık derecesi, hidrojenin gücü
<b>UV:</b>		Ultraviyole
<b><math>\beta</math></b>	:	Beta

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamda değerli katkıları, yönlendirici önerileri ve desteklerinden dolayı danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca tez çalışmamın çeşitli aşamalarındaki değerli yardımlarından dolayı Uzman Mehmet Emin DİKEN ve Dr. Ümran ALAN'a, örneklerin temini konusundaki yardımlarından dolayı Bornova-Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Seyfi ÖZİŞİK ve Dr. Cem TOKER'e, desteklerini hayatım boyunca hissettiğim Annem, Babam ve Kardeşlerime, sevgi ve anlayışları için Eşime ve Oğluma en içten teşekkürlerimi sunarım.

## 1. GİRİŞ

Zeytin yaprakları toplandıktan sonra yüksek oranda nem içermeleri nedeniyle bozulmaya, kullanılabilirlik vasıflarını yitirmeye son derece açıktır. Bu nedenle yaprakların toplandıktan kısa bir süre sonra kurutulmasıyla işlenecekleri zamana kadar güvenli bir şekilde depolanmaları gerekmektedir. Yaprakların toplanması için ağacın sağlığı açısından en elverişli zaman budama dönemi olup, budanmış dallardan yaprakların elde edilmesidir. Ancak budama mevsiminin kış aylarına isabet etmesi nedeniyle doğal yöntemlerle kurutma işleminin uzun sürmesi, yapraklardaki su miktarına bağlı olarak meydana gelen mikrobiyal bozulmalar ve solunum sonucu ortaya çıkan ısınma ile kalite kayıplarının olması yaprakları kullanılamaz hale getirebilmektedir. Kurutma aşamalarında ortaya çıkan bu problemler hızlı kurutma yöntemlerini bir zorunluluk haline getirmektedir. Ancak hızlı kurutma yöntemlerinden hangisinin ürünün fenolik yapısı ve antioksidan kapasitesinin nasıl etkilediğinin bilinmesi uygun kurutma yönteminin belirlenmesi için önemli bir katkı sağlayacaktır. Bu çalışma, çay, kozmetik ve farmakoloji endüstrisi için bir hammadde teşkil eden zeytin yapraklarının içermiş olduğu fenolik ve antoksidan moleküllerin en az kayıpla elde edilebileceği yöntemlerle kurutulup kullanılması konusunda deneysel temellere dayanan bir fikir alt yapısı oluşturmaktadır. Literatürde endüstriyel uygulamaya yansıtılabilirliği dikkate alındığında, ürünün hem proses, hem de biyokimyasal yönünü ele alan bir çalışma olması bakımından önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

### 1.1 Serbest Radikaller

Bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron içeren molekül veya molekül parçacıkları serbest radikal olarak adlandırılmaktadır. Eşlenmemiş elektron içeren serbest radikaller sabit olmayıp son derece reaktiftirler. Serbest radikaller istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarına neden olarak DNA hasarı, protein modifikasyonları, lipid peroksidasyonu ve DNA parçalanmalarına bağlı olarak hücre ölümlerine neden olmaktadır. Serbest radikallerin yaşlanma, kalp-damar rahatsızlıkları, katarakt,

kanser, gastrointestinal organlarda kronik iltihaplar, solunum yolu rahatsızlıkları, iskemi gibi birçok rahatsızlığın etkenleri arasında olduğu belirtilmektedir [1]. Serbest radikaller vücut metabolizmasının doğal bir sonucu olduğu gibi gıdalar, hava kirliliği vb. etmenler ile dışarıdan da alınabilmektedirler [2]. Antioksidanlar ise oksidasyon süreçlerini inhibe eden maddelerdir [3]. Canlı hücrelerin okside olabilir nitelikli bileşenleri olan lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi moleküller antioksidan etkili bileşiklerle oksidasyondan korunmaktadırlar. Hücrelerin önemli moleküllerinin korunduğu bu sisteme antioksidan savunma adı verilmektedir [4]. Normal metabolizmanın işleyişinde serbest radikal oluşumunun temel unsuru olan reaktif oksijen türevleri (ROT) ile antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Ancak güneş ışınları, bazı gıda katkı maddeleri, kozmetik ürünler, gıda veya çevresel kaynaklı kirlenici kimyasallar gibi birçok etken ile vücutta oluşan ROT ve antioksidanlar arasındaki denge ROT yönüne kayabilmektedir. ROT artışı ise genetik değişiklikler ile anormal hücre fonksiyonuna yol açmaktadır [5]. Canlı organizmalardaki bazı önemli ROT çeşitleri Tablo 1.1'de [6], ve bazı serbest radikal kaynakları ise Tablo 1.2'de [6] verilmiştir.

**Tablo 1. 1:** Canlı organizmalardaki önemli ROT çeşitleri

Serbest radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil radikal	OH	Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Süperoksit radikal	O <sub>2</sub>	Singlet oksijen	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Nitrik oksit radikal	NO	Hipoklorik asit	HOCl
Lipidperoksil radikal	LOO	Ozon	O <sub>3</sub>

**Tablo 1. 2:** Bazı serbest radikal kaynakları

Organizma İçi Kaynaklar	Organizma Dışı Kaynaklar
Mitokondri	Sigara dumanı
Fagositler	Çevresel kirleticiler
Ksantinoksidaz	Radyasyon
Demir ve diğer geçiş maddelerini içeren reaksiyonlar	Ultraviyole ışık
Arakidonat yolları	Bazı ilaçlar
Peroksizomlar	Böcek ilaçları
Egzersiz	Anestezi
İltihap	Endüstriyel çözücüler
İskemi / reperfüzyon	Ozon

Antioksidan bileşikler oksidatif ve otooksidatif reaksiyonların başlangıç aşamasında etki göstererek oksidasyonu ve oksidasyona bağlı istenmeyen reaksiyon ürünlerinin oluşumunu engelleyebilmektedir [7]. Vitaminler, fenolik ve antioksidan bileşenler yönünden zengin olan meyve-sebze gibi bitkiler hayvan ve insan diyetinin önemli kaynağını oluşturmaktadır [1]. Bu nedenle özellikle bitkilerin antioksidan içerikleri ve etki mekanizmaları günümüzün ve geleceğin önemli araştırma konularından biri olmaya devam etmektedir.

## 1.2 Antioksidan Aktivite

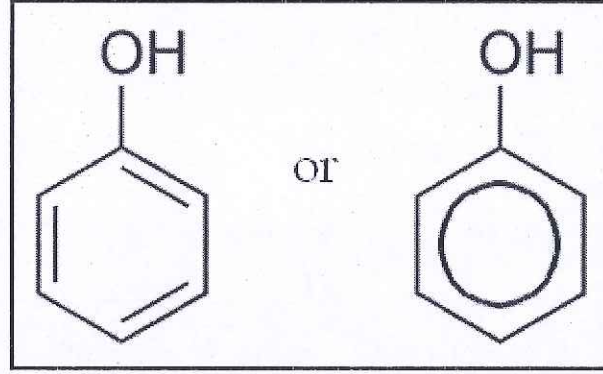
Biyolojik sistemlerde oksidatif stres sonucu oluşan ROT'in meydana getirdiği hasarı önlemek için, vücutta birçok savunma sistemi gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar, belirli düzeyi aşmış oksidan moleküllere doğrudan etki ederek onları etkisiz hale getiren moleküllerdir [8]. Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu

sırada serbest radikal haline gelmemeleridir [9,10]. Antioksidanlar radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumludurlar [11]. Hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterir ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürürler. Antioksidanlar, lipit peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmasını ve DNA mutasyonunu engellerler. Bu foksasyonlarını dört farklı mekanizma ile gösterirler: **1) Temizleme (Scavenging) etkisi:** Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde meydana gelmektedir. **2) Baskılama (Quencher) etkisi:** Bu etki, oksidan maddelere bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olmaktadır ve çoğunlukla flavonoidler tarafından yapılmaktadır. **3) Onarma etkisi:** Oksidanların oluşturduğu hasarı ortadan kaldırma şeklinde etki göstermektedirler. **4) Zincir koparma etkisi:** Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen bu etki hemoglobin ve E vitamini tarafından yapılır [12]. Antioksidanlar sıklıkla intraselluler bazen de ekstraselluler olabilirler ve yapısında genellikle fenoliki yapı taşıyan moleküllerdir [13,14]. Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Enzimatik antioksidanlar; superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon reduktaz (GR), glutatyon s-transferaz (GST) ve glukoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PD); non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E ( tokoferoller), vitamin C (askorbik asit), vitamin A (s-karoten), selenyum, transferin, laktoferin, urik asit, glukoz, askorbat, albumin, bilirubin ve seruloplazmindir [15]. Bitkilerde ise farklı antioksidan bileşiklerin meydana geldiği bilinmektedir. Doğal antioksidanların başlıcaları karetenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyon ve endojen metabolitleridir [11]. Ayrıca bitkilerde bulunan fenolik maddelerin doğal antioksidanların en önemli gruplarından biri olduğu söylenebilir [16].

### 1.3 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazlası da hidroksil grubu içeren organik bileşikler olarak tanımlanabilirler (Şekil 1.1). Fenolik yapıdaki aromatik halka benzen halkasıdır ve hidroksil grupları mevcut aromatik halkadan etkilenmektedir. Aromatik halka nedeniyle fenolik hidroksillerin




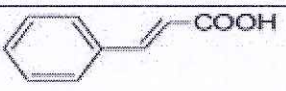
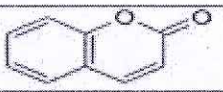
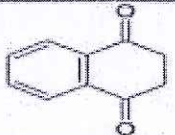
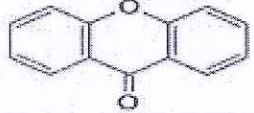
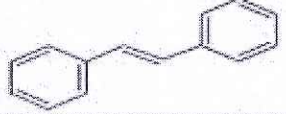
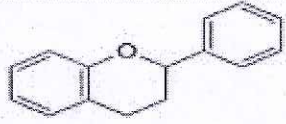
hidrojenleri kararsızdır ve bu yüzden fenoller zayıf asidik özellik göstermektedirler [17].



Şekil 1. 1: Basit fenol yapısı[18].

Sekonder metabolitler olan fenolik bileşikler bitkiler için karakteristik özellik gösterir ve genellikle serbest halde olmayıp ester ya da glikozit formda bulunmaktadır [19]. Birden fazla OH grubu içeren fenolik bileşikler hidrofilik özellik gösterirler ve karboksilik asit ile glikozitleri sayesinde su gibi çözücülerde kolayca çözünebilirler. Bazıları sadece organik çözücülerde çözünürken, son grup fenolik bileşikler ise büyük, çözünmez polimerlerdir [19, 20, 17]. Bitkilerde bulunan fenolik yapılar yaklaşık 10000 çeşit bileşiğin yer aldığı kimyasal olarak heterojen bir grup olarak bilinmektedir [17]. Fenolik bileşikler içerdikleri karbon atomu sayısına göre sınıflandırılmıştır (Tablo 1.3).

**Tablo 1. 3:** Fenolik ve polifenolik bileşiklerin temel yapısı [17].

Karbon Sayısı	Yapı iskeleti	Sınıflandırma	Örnek	Genel Formülü
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Fenolik asitler	Gallik asit	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Asetofenonlar	Xanthoxylin	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Fenilasetik asit	p-hidroksifenil-asetik asit	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hidroksi sinnamik asitler	Kafeik asit	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Kumarinler	Eskuletin	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftokinonlar	Juglon	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Gentisin	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbenler	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidler	Kuarsetin	

Meyve ve sebzelerde oldukça fazla türde fenolik bileşik ihtiva etmektedirler [21]. Bu bileşikler bitkinin meyve, tohum, gövde, dal, yaprak ve çiçek gibi organlarında bulunmaktadır. Hücre içerisinde ise sitoplazma, hücre duvarı, vakuolde yer almaktadırlar [22].

Bilindiği gibi fenolik bileşikler bitkilerde önemli derecede fizyolojik ve metabolik öneme sahip olan ve fazla miktarda bulunan sekonder metabolitlerdir [23]. Halka yapılarında oluşan oksidasyon, glikosilasyon, metilasyon ve hidroksilasyonlar bu bileşiklerin bitkide pek çok biyolojik fonksiyonda rol almalarını sağlamaktadır [24]. Söz konusu bileşikler, bitkiler tarafından mikroorganizmalara ve güçlü UV ışınlarına karşı koruma mekanizması için de sentezlenmektedirler [25]. Literatürde fenolik bileşikler olan fenolik asitlerin ve flavonoidlerin bir grubunun antibiyotik, antifungal ve antiinflamatuvar olarak görev yaptığı ifade edilmektedir [16]. Bu

bileşikler bitkinin yaralanması halinde kimyasal bir bariyer oluşturarak bitkiyi hastalıklara ve çürümelere karşı korumaktadırlar. Fenolik bileşiklerin bitki hastalıklarında etkin rol oynama sebeplerinden bir tanesi oksidasyon ürünlerinin yüksek toksik etkiye sahip olmasıdır. Bitki hastalandığı zaman fenolik bileşiklerin sentezlerinde ve aktivitelerinde artışlar meydana gelmektedir. Bu özellikleri ile fenolik bileşikler bitkilerin hastalığa karşı dayanıklılığını artırmaktadır [26]. Ayrıca doğal antioksidan özelliğe sahip olmalarından dolayı bitkilerdeki fenolik bileşiklerin varlığı çok önemli bir kazançtır [25]. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, oksidasyon sonucu oluşan serbest radikallere hidrojen vererek onları söndürmelerinden ileri gelmektedir. Aynı zamanda fenolik bileşikler metalleri şelatlama eğilimindedirler. Hidroksil ve karboksil gruplara sahip fenolik bileşikler demiri şelatlayarak etkisizleştirebilir ve fenton reaksiyonlarını baskılayabilirler. Fenolik bileşiklerin şelatlama yetenekleri muhtemelen aromatik halkanın yüksek nükleofilik yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Metal iyonları oksijen-oksijen bağlarının homolitik parçalanmasıyla lipid hidroperoksitleri yıkar ve lipid alkoksil radikallerini oluşturur. Ayrıca lipid alkoksil radikallerini yakalayıp lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Flavonoidlerin içerdikleri yapısal ve elektrokimyasal özellikleri ile lipid peroksidasyonunu baskıladığı, lipid oksidasyonunu indirgeyerek membran yapısını koruyan antioksidan etkinliklerde rol oynadığı ileri sürülmektedir [27,17, 24]. Doğal bitkisel antioksidan moleküller olan bu bileşiklerin en yaygınları fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bahsi geçen bileşiklerin besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir. Bu nedenle uzun yıllardır besinlerin koku ve tat gibi özelliklerini arttırmak için katkı olarak kullanılan baharat vb. olarak gıda sektöründe kullanılmaktadırlar [16]. Gıda sektöründe koku ve tat yanı sıra önemli olan diğer bir etken de görünüşdür [23]. Meyve ve sebzelerin toplanması, depolanması veya onlarla yapılan işlemler sırasında dokularının zedelenmesi, kesilmesi, kabuklarının soyulması sonucu renklerinde değişim meydana gelebilir. Bu renk bozunmaları enzimatik ve enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Sebze ve meyvelerin enzimatik kararması içerdikleri fenolik bileşiklerin lakkaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz enzimleri tarafından oksidasyonu ile ilişkilidir. Bu bileşikler oksijen varlığında oksidasyon sonucunda kahverengi, kırmızı ve siyah pigmentlere yani yüksek derecede kararlı olmayan kinonlara dönüşmektedir. Meyve

sebzelerde meydana gelen bu renk değişimleri besin değerinin düşmesi nedeniyle istenmeyen bir durum iken çay, kahve ve kakaonun üretiminde ise enzimatik kararma istenilen önemli birprosestir [21]. Polifenoller bronzlaşma ajanı ve katkı olarak yiyecek endüstrisinde kullanılmalarının yanı sıra, kozmetik, boya ve kâğıt üretimi gibi birkaç endüstriyel alanda da kullanılmaktadırlar [16]. Fenolik bileşiklerin doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olduğu da bildirilmiştir [23, 28]. İnsanda hastalıklara sebep olan serbest radikallere karşı koruyucu etki göstermekte ve yaşlanmayı geciktirmektedirler [17]. Sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle farmakolojik çalışmalar içerisinde yer almaktadır [29, 30]. Enzim inhibisyonu ve protein denatürasyonu yaparak antioksidan aktivite gösterirler [31]. Fenolik bileşiklerin anti-karsinojen, anti-atherojen, anti-ülser, anti-inflamator, anti-mikrobiyal etkileri olduğu belirtilmektedir [17]. Ayrıca antioksidan olarak kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları, yaşlılık hastalıkları vb. birçok hastalığı da engelleyebildikleri ifade edilmektedir. Bu nedenle fenolik madde içeriği yüksek olan meyve ve sebze tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azaltmakta ve sağlık üzerine olumlu etkide bulunmaktadır [23]. Gıda ve farmakolojik açıdan önemi büyük olan bu bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesi için bulunduğu ortamdan izole edilmesi gerekmektedir [29].

#### 1.4 Zeytin Yaprağı ve Zeytin Yaprağındaki Fenolik Bileşikler

Zeytin (*Olea europaea*), zeytingiller (*Oleaceae*) familyasından meyvesi yenen Akdeniz iklimine özgü çalı veya 10 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, herdem yeşil yapraklı bir ağaçtır. Yapraklar mükemmel bir düzen içinde dalın iki tarafından karşılıklı olarak çıkmaktadır [32]. Zeytin yaprağı basit, kalın ve derimsi lanselottan abovata kadar farklı şekillerde, 30-50 mm uzunluğunda, 10-15 mm genişliğindedir. Mukrolu bir uca sahiptir ve tabanda gittikçe incelerek yaprak sapını oluşturur, laminanın kenarları ise düzdür. Üst yüzeyi grimsi yeşil olan yapraklar pürüzsüz ve parlaktır. Alt yüzeyi ise mavimsi, soluk renkli ve kısa yumuşak tüylerle kaplıdır [33, 34].



**Şekil 1. 2:** Zeytin yaprağı

Eski zamanlardan beri zeytin yaprağı Akdeniz bölgesi ve barışın sembolü olarak bilinmektedir [32]. Zeytin yaprakları fonksiyonel değere sahip olan biyoaktif bileşenlerin doğal bir kaynağıdır. Zeytin yaprağında bulunan fenol bileşenlerinin pek çoğunun antioksidan, antifungal, antibakteriyel özellikler gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [35]. Yapılan araştırmalara göre, zeytin yaprağı bazı element, vitamin ve yağlar gibi mikro besinler dahil yüz kadar farklı kimyasal madde içermektedir. Bu maddeler arasında özellikle fenolik bileşikler ve türevlerinin, zeytin yaprağının biyolojik etkilerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir [36]. Zeytin yaprağı başlıca flavonoidler, sekoiridoitler ve triterpenler olmak üzere üç farklı etkili madde grubuna ait bileşikleri içerir. Triterpenlerin oranı % 3-4 kadar olup en çok bilinen; oleonik, krataegolik asitler, homoolestranol ile bunların glikozitleridir [34]. Zeytin yaprağı ekstresinde ise başlıca beş grup fenolik bileşik bulunur; oleuropeosidler(oleuropein ve verbascoside), flavonlar (luteolin-7-glukozit, apigenin-7-glukozit, diosmetin-7-glukozit, luteolin ve diosmetin), flavonoller (rutin), flavan-3-oller (kateşin) ve substitue fenoller (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilik asit ve kafeik asit) [37]. En önemli etkili madde oleuropeozit (oleuropeoside) adıyla bilinen bir sekoiridoit glikozittir [34]. Bu etken maddeler içerisinde zeytin yaprağında en çok bulunan, biyoaktif özellik gösteren bileşenler oleuropein, hidroksitirozol ve rutin olarak bulunmuştur [32, 38]. Zeytin yapraklarının kimyasal bileşimi, zeytin ağacının türü, yetiştiği bölge, iklim, dalların

ağaca oranı, zeytin yaprağının yapısal karbonhidrat ve azot içeriği gibi çeşitli şartlara bağlı olarak değişir [39, 40]. Önemli etkenin genetik faktör olduğu, ayrıca genç yaprakların olgunlara göre, ilkbaharda hasat edilen yaprakların son baharda hasat edilenlere göre daha yüksek düzeyde fenolik bileşik içerdiği bilinmektedir [25]. Hasat zamanı, uygulanan kültürel tedbirler, saklama şartları, nem içeriği, toprak ve yağlar ile kontaminasyonun derecesi gibi faktörlerden de etkilenir [39, 40].

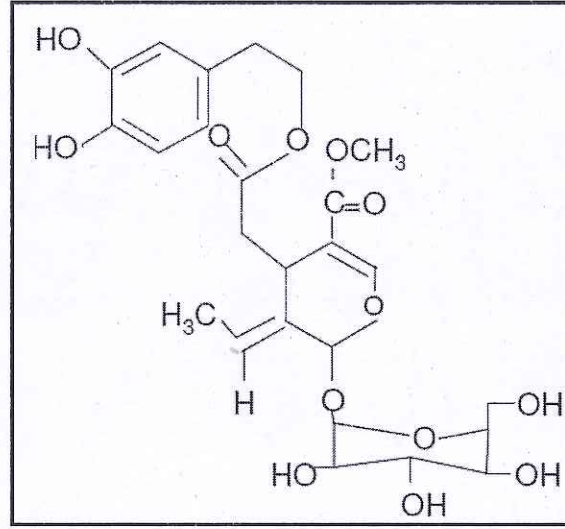
Tarih boyunca zeytin yaprağı ateş ve sıtma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Zeytin yaprağı fenolik içeriği sayesinde potansiyel doğal bir antioksidan kaynağıdır [32]. Ülkemizde zeytin yaprakları halk arasında dâhilen iştah açıcı idrar söktürücü, haricen yara temizelemede kullanılmaktadır. Ayrıca zeytin kabuğu ve yaprağının sıtma ve adenopatide kullanıldığı, zeytin yaprağının metanol ekstresinin güçlü antikomplementer etki taşıdığı ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu etkinin ise içerdiği flavonoidlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Fas'ta halk arasında yaprakların diyabet tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir [33]. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda hayvanlara oral yolla verilen zeytin yaprağı preparatlarının böbrek ve karaciğer doku hasarını büyük oranda engelleyici etki gösterdiği belirtilmiştir [41]. Afrika, Yunanistan ve Güney Afrika Cumhuriyeti'nden elde edilen zeytin yapraklarından oleanolik ve ursolik asit izole edilmiştir. Bu terpenik asitler ile sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde hipoglisemik, antiaterosklerotik ve antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [42]. Zeytin yaprağı ekstrelerinin deney hayvanlarında kan basıncını düşürdüğü, koroner arterlerinde kan akışımı hızlandırdığı, aritmiyi engellediği, bağırsak kasları spazmlarını önlediği gözlemlenmiştir [36]. Akdeniz beslenme tarzının insan sağlığı üzerinde yarattığı olumlu etkinin en önemli nedenlerinden birisinin diyetteki fenolik madde içeriğinin yüksek olmasıdır. Zeytin yaprağından elde edilen ekstraktın kalp damarlarındaki kanın akışımı arttırdığı, kanın pıhtılaşmasını düzenlediği, kan dolaşımını rahatlattığı ve bundan dolayı kalp rahatsızlıklarını ve krizlerini önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [38, 43]. Aynı zamanda LDL (LowDensity Lipoprotein-Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) oksidasyonunu engellemesi yönüyle de kalp-damar hastalıklarının önlenmesinde etkin olduğu, adrenalin üzerine etki ederek kan basıncını düzenleyici ve kalp rahatsızlıklarını önleyici etkisinin bulunduğu belirlenmiştir [38]. Zeytin yaprağı ekstrelerinin bağırsaklardaki ritim bozukluklarını azaltıp kas kasılmalarını önlediği bilinmekte ve tümör nekrosis faktörünü önleyici etkisinden dolayı alerji tedavisinde kullanımı önerilmektedir. Zeytin

yaprağının antioksidan özelliğinden yola çıkılarakdiabet (şeker hastalığı) üzerine etkileri incelenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır [36,38]. Aynı zamanda, zeytin yaprağı ekstraktının akciğer epitel hücrelerinde meydana gelen iltihabi (inflamatuvar süreç) hastalıklar sonucu oluşan serbest radikalleri önleyici etkisi tespit edilmiş ve tedavide kullanımı önerilmiştir [44]. Zeytin yaprağından ekstrakte edilen maddelerin, günümüzde oldukça kritik önemde olan kansere karşı etkileri de araştırılmakta, özellikle prostat, kolon kanseri gibi kanserlerin tedavisinde kullanımına dair sonuçlar umutverici olmaktadır [38]. Zeytin yaprağının tüm bu özellikleri onun içerdiği fenolik bileşiklerden ileri gelmektedir.

#### 1.4.1 Oleuropein

Zeytin ağacı önemli biyolojik özelliklere sahip fenolik maddelerce zengin olup, bu fenolik bileşenlerin başlıcası oleuropeindir. İlk kez 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilen bu bileşiğin yapısı ancak 1960 yılında tanımlanabilmiştir. Buna göre oleuropein, elenolik asit ve hidrokstitriazolün heterozidik esteridir (Şekil 1. 3). Oleuropein, zeytin meyvesinin ilk dönemlerinde meyvede daha fazla bulunan, olgunlaşmanın ilerlemesi ile zamanla metabolize olarak miktarı azalan ve meyveye acılık veren bir maddedir [45, 46,47]. Oleuropein zeytin ağacının tamamında; zeytinde, posasında, yağında ve zeytinyağı imalatı esnasında açığa çıkan atıklarda bulunmakla birlikte, bu bileşiğin doğada bilinen en önemli kaynağı zeytinciliğin yan ürünü olan zeytin yaprağıdır (60-90 mg/g kuru ağırlık). Bu konudaki çalışmalarda; zeytinyağında oleuropein içeriğinin %0.005-%2 arasında, zeytin yaprağında ise %1-14 arasında olduğu bildirilmektedir [45]. Fenolik bileşenlerin antioksidan aktivite yanında çeşitli biyolojik etkinlikleri de söz konusudur. Örneğin oleuropein ve hidrokstitriazol sentetik radikalleri, peroksit radikallerini, süper oksit radikallerini ve hidroklorik asiti yakalama ve inaktif hale getirme etkisi göstermektedir. Vücutta çeşitli rahatsızlıklara neden olan serbest radikalleri etkisiz hale getirmek suretiyle vücut direncini artırıcı etkisi bundan kaynaklanmaktadır [48]. Oleuropeinin antioksidan, antimikrobiyel, antienflamatuvar, antiaterojenik, antikarsinojenik, antiviral aktiviteler dahil olmak üzere çok sayıda farmakolojik özelliğe sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar, yüksek miktarda oleuropein içeren zeytin yapraklarından elde

edilen fenolik fraksiyonun, lipoprotein oksidasyonunu önlediği ve bu nedenle besin takviyesi olarak önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca oleuropeinin ana biyoaktif metaboliti hidrokstitriosolün, doğal olarak elde edilengüçlü bir antioksidan olduğu, diğer yapısal alt birimi elenolik asitin ise güçlü antiviral etki gösterdiği bildirilmektedir. Bunun yanısıra oleuropeinin alzheimer hastalığının etyolojik faktörü A- $\beta$  amiloid peptid ile non-kovalent kompleks oluşturduğu ileri sürülmektedir [45].

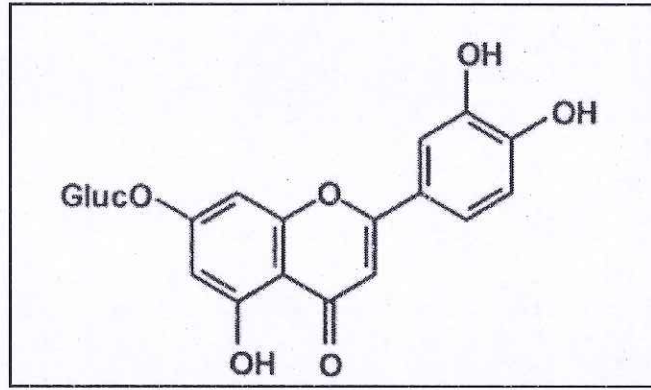


Şekil 1. 3: Oleuropeinin kimyasal yapı formülü[49].

#### 1.4.2 Luteolin 7-glukozid

Zeytin yaprağında oleuropin dışında altı farklı flavonoid grubu madde (luteolin 7-*o*-glukozit, luteolin 7-*o*-rutinozit, apigenin 7-*o*-glukozit, rutin, luteolin ve apigenin) daha tanımlanmıştır [50]. Flavonoidlerden flavon grubunda yer alan luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon) kekik, maydanoz ve enginarında yüksek oranda bulunurken; şekerpancarı, lahana, karnabahar, soğan, havuç, brokoli, mısır gibi çeşitli sebzelerde değişen oranlarda bulunmakta ve besinlerle günlük ortalama 2 mg kadar alınmaktadır. Flavonoidlerin önemli üyelerinden bir olan luteolinin kuvvetli bir serbest radikal süpürücü olduğu ve antiinflamatuvar ve anti alerjik etkileri de içeren geniş farmakolojik özellikler gösterdiği belirtilmektedir. Luteolin ile ilgili yapılan çalışmalar antioksidan özellikleri ve antiproliferatif etkileri üzerine odaklanmıştır. Literatürde luteolinin, enginar yaprağı ekstraktının antioksidan aktivitesine katkıda

bulunarak,  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları aracılığıyla meydana gelen LDL oksidasyonunu engellediği rapor edilmiştir. Luteolinin DNA topoizomera I ve II'yi, tümör hücrelerinin çoğalmasında rol oynayan triozin kinazı inhibe etmesi ve apoptozisi indüklemesi nedeni ile kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir [51]. Buna ek olarak literatürde karahindiba çiçek özünde *in vitro* şartlarda;  $20\mu\text{M}$  daha düşük konsantrasyonlarda bulunan luteolin ve luteolin-7-*o*-glikozit, nitrik oksit ürünlerini ve prostaglandin E2 (PGE2) aktif-fare makrofaj RAW264.7 hücreleri önemli ölçüde bastırdığı tespit edilmiştir [52]. Antikanserojen potansiyeli bulunan luteolin-7-*o*-glukozit (LUT7G), dört farklı kanser hücre (COLO 320, DM, AGS, MCF-7 ve A549) ve normal Vero hücre hatlarına karşı incelenen çalışmada apoptozisin (sağlıklı kalınabilmesi için programlanmış hücre ölümlerinin) gerçekleştiği tespit edilmiştir [53]. Luteolin 7-glukozidin kimyasal yapı formülü Şekil 1.4' de verilmiştir.

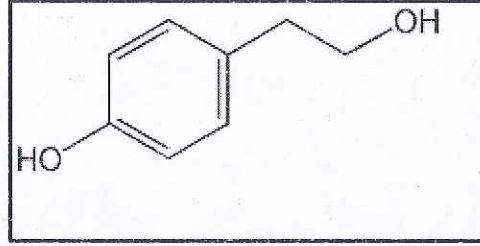


Şekil 1. 4: Lüteolin7-glukozidin kimyasal yapı formülü [54].

### 1.4.3 Tirozol

Tirozolfenetil alkolün bir türevi olan feniletanoiddir. Çeşitli besin kaynaklarında doğal bir fenolik antioksidan olarak bulunur. İnsan diyetinin başlıca kaynaklarından olan zeytinyağı ve argan yağının doğal fenolik bileşikleri arasında yer almaktadır [55]. Fenol olarak da bilinen tirozolün, 4-(2'-Hidroksietil), fiziksel ve zihinsel yorgunluklarda, hafıza kayıplarında yardımcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Diğer fenol bileşiklerde olduğu gibi, yapısındaki hidroksil grubundan bir hidrojeni serbest radikallere vererek onları etkisiz hale getirmekte ve bunun sonucunda da kendisinin okside olduğu belirlenmiştir [56]. Antioksidan etki gösteren

tirozolün oksidasyon nedeniyle yaralanmalara karşı hücreleri koruduğu bilinmektedir. Zeytin yağında diğer antioksidan bileşikler kadar olmasa da mevcut olan tirazolün yüksek konsantrasyonlarda biyoyararlılığının önemli olduğu rapor edilmiştir. Tirazolün miyokardı koruma etkisi nedeniyle kalp için anti-aging bir molekül olduğu düşünülmektedir [55]. Tirozol kimyasal yapı formülü Şekil 1.5' de verilmiştir:

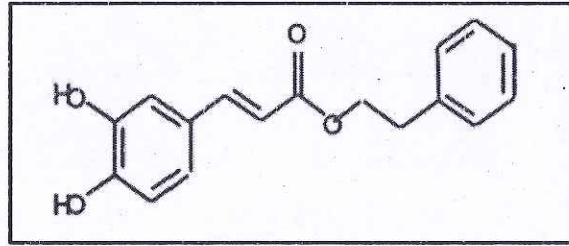


Şekil 1. 5: Tirazolün kimyasal yapı formülü [57].

#### 1.4.4 Kafeik Asit

Kafeik asit, hidroksisinnamik asit olarak sınıflandırılan organik bileşiktir. Yapısında fenolik ve akrilik fonksiyonel gruplarını içermektedir [58]. Kafeik asit birçok bitki ve besinlerde bulunan bir kimyasaldır. İnsan diyetindeki kafeik asitin birincil kaynağı kahvedir. Ancak, elma, enginar, çilek ve armut gibi diğer gıda kaynakları bulunabilir [59]. Kafeik asitin, okaliptus (*Eucalyptus globulus*) kabuğu, tatlı su eğreltisi (*Salvinia molesta*) veya mantar (*Phellinus linteus*), argan yağı ve arpa tohumunda da olduğu bilinmektedir [58]. Kafeik asit, immünomodülatör, antiproliferatif, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan, sitostatik, antibakteriyel, antifungal özellikte olan ve son yıllarda üzerinde yoğun çalışmalar yapılan bir moleküldür. Güçlü bir antioksidandır ve serbest radikallerin oluşumunu engeller [60]. Kafeik asit atletik performans arttırmak için, egzersiz ile ilgili yorgunluklarda, kilo kayıplarında ve kanser, HIV/AIDS, herpes, gibi diğer durumlarla da mücadelelerde de kullanılmaktadır [59]. Kafeik asitin farmakolojik etkileri arasında *in vitro* hayvan modellerinden insan HT-1080 fibrokarsinoma hücrelerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kafeik asit etkisiyle karsinogenesisin inhibe olduğunu ve kolon kanserininin büyümesinde gerileme görüldüğü belirlenmiştir [58]. Meme kanseri (BC) hastalar, diğer kanser türleri hastalarına göre alternatif ve daha doğal

ilaçlar kullanırlar. Özellikle alternatif tıbbın bir tipini % 63-83 oranında ve bu oranında%25-63'ünü bitkiler ve vitaminler oluşturmaktadır. Balarısından elde edilen doğal tıbbi ürün olan propolis; CAPE (kafeik asit fenil ester) içermektedir. CAPE; tümörlerin büyümesini engellemesi konusunda genler ve protein ifadeleri üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [61]. Kafeikasitin kimyasal yapı formülü Şekil 1.6' de verilmiştir:

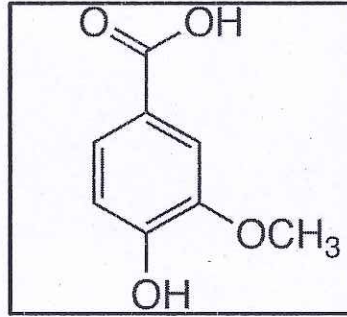


Şekil 1. 6: Kafeik asitin kimyasal yapı formülü [61].

#### 1.4.5 Vanilik Asit

Zeytin yaprağıfenolikleri içerisinde oleuropeinden daha düşük antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşen vanilik asit olmakla beraber, tirozolden daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahiptir [36]. Vanilik asit, bir tatlandırıcı ajan olarak kullanılan benzoik asitin türevidir. Vanilinin ferulik asite dönüşümü sırasında üretilen vanilinin okside formudur. Vanilik asit, vanilinin okside formu olarak Çin'de geleneksel tıpta kullanılan vanilya çekirdekleri *Angelica sinensis* bitkisinde tespit edilmiştir [62]. Vanilik asit, yeşil çay çikolata ya da kahve tüketiminden sonra insan idrarında tespit edilen, antimikrobiyal ve antimalarial aktivitesi bulunan kafeik asitin bir metabolik ürünüdür. Güzel kokusu nedeniyle gıda katkı maddesi olarak da popüler hale gelen, kozmetik, gıda ve ilaç sanayinde antiseptik ve koruyucu olarak kullanılan önemli bir bileşendir [63, 62]. Çeşitli çalışmalar vanilik asitin immün ya da inflamatuvar yanıtların yönetimindeki etkisinin olduğuna dair kanıtlar sağlamaktadır. Örneğin vanilik asit insan periferik mononükleer kan hücrelerinde interferon-gamma sekresyonunu ve insan lenfosit proliferasyonunun etkinliğini

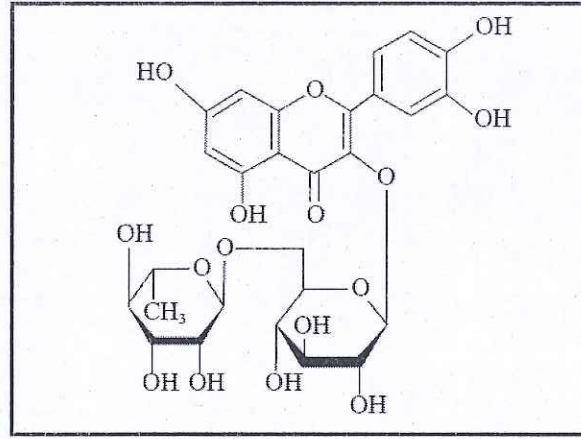
geliştirebildiğini tespit edilmiştir. Çalışmalar vanilik asitin karaciğer hasarında meydana gelen inflamasyonu baskılayarak hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) etki gösterdiğini de ortaya koymuştur [64]. Vanilik asit yılan zehiri aktivitesinin inhibe edilmesi, karsinogenesis, apoptosiz ve inflamasyon gibi çeşitli farmakolojik aktivitelerle de ilişkilendirilebilir [62]. Vanilikasitin kimyasal yapısına ilişkin formül Şekil 1.7 de verilmiştir.



Şekil 1. 7: Vanilik asitin kimyasal yapı formülün [65].

#### 1.4.6 Rutin hidrat

Zeytin yaprağı fenolikleri içerisinde en güçlü antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşen rutindir [36]. Rutin bileşeninin kolesterol ve kalp sağlığı bakımından yararlı olduğu ve antioksidan aktivitesinin bulunduğu [66], değişik kas gruplarındaki istemsiz kompleks hareketlere neden olan tardivdiskinezi hastalığının tedavisinde yüksek doz rutin kullanımının deney hayvanlarında hastalık seyrini tersine çevirdiği [67] ve kalp koruyucu aktiviteye sahip olduğu [68] yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Rutinin kimyasal yapı formülü Şekil 1.8' de verilmiştir:

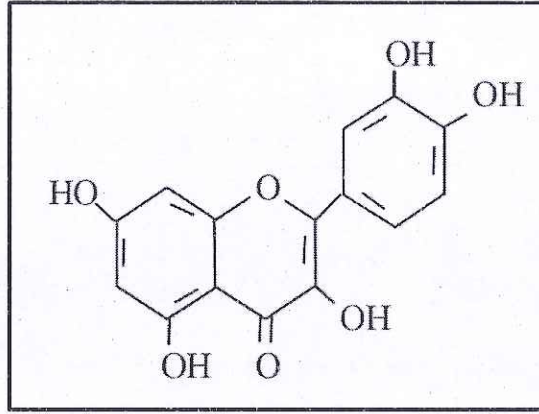


Şekil 1. 8: Rutininkimyasal yapı formülü[69].

#### 1.4.7 Kuersetin

Kuersetin (3,3', 4',5,7-penta hidroksiflavon) flavonoidlerin alt grubu olan bir polifenolik bileşiktir [70]. Besin takviyesi olarak popüler bir şekilde kullanılan bitkisel kaynaklı bir flavonoiddir [71]. Meyve ve sebzelerde çokça bulunan kuersetinin, sudaki çözünürlüğünün az olduğu bildirilmiştir. Elma ve soğan başta olmak üzere, kırmızı şarap, greyfurt, siyah çay, ahududu, yaban mersini, kiraz, brokoli gibi içecek ve yeşil sebzelerde çokça bulunur. Kuersetinin yararlı etkileri, diğer flavonoidlerde de olduğu gibi alımına, emilimine metabolizmasına ve atılımına bağlı olarak değişmektedir. Kuersetinin birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri açıklanmıştır. Lösemi, kolon, meme, akciğer, hepatoma ve prostat dahil olmak üzere birçok insan kanser hücresi hatlarında anti-kanser faaliyetlere sahip olduğu söylenmektedir. Kuersetinin potansiyel kemopreventif etkileri, antioksidatif aktivitesinin yanı sıra karsinojenleri aktive eden enzimleri inhibe etme, hücre reseptörleri ve diğer proteinleri regüle etme gibi çeşitli mekanizmalarla anlatılmıştır. Bunun yanında kuersetinin pulmoner ve kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini azalttığı tespit edilmiştir. Reaktif oksijen türlerini yakalama özelliğiyle de kuersetinin yararlı etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir, hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir, kolesterolü düşürüp kalp ve akciğer hastalıklarını engelleyebilir ve akciğerleri koruyabilir şeklinde düşünülmektedir. Kuersetin, antihistaminik etkisinden ötürü alerji ve astım tedavisi için de tavsiye edilmektedir [72]. Sağlık yararları açısından geniş bir yelpazeye sahip olduğu bilinen kuersetin laboratuvar ortamında ya da yapay

koşullarda yapılan araştırmalarda, histamin üretimini durdurarak anti-inflamatuar aktivitenin yüksek miktarda olduğunu ortaya koymaktadır. Antitümör aktivitesi bilinen, kültürlü ve prostat kanseri hücreler kuersetinin bir dozu ile tedavi edildiğinde yüksek seviyede ölümlerine neden olduğu ortaya koyulmaktadır [71]. Kuersetin kimyasal yapı formülü Şekil 1.9' de verilmiştir:



Şekil 1. 9: Kuersetininkimyasal yapı formülü[73].

## 1.5 Amaç ve Kapsam

Zeytin yaprağı ektresinin içermiş olduğu fenolikler ve flavonoidler metabolik savunma gücünü önemli oranda artırır. Özellikle içeriğindeki oleuropein ve elanoik asit aktif bileşenlerinin doğal antibiyotik ve antioksidan moleküller olduğu, antimikrobiyal ajan olarak görev yaptığı bilimsel araştırmalarca da kaydedilmiştir. Bu nedenle günümüzde zeytin yaprağı ekstresi oldukça yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Zeytin yaprağının bu zengin antioksidan içeriğinin iyi muhafaza edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada zeytin yapraklarının kurutulmasında antioksidan içeriğin maksimum olduğu en elverişli kurutma yönteminin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca çalışmanın diğer bir amacı da konuyla ilgili Türkiye şartlarındaki çalışmaların sayısını artırmak suretiyle bu alanda zengin bir bilimsel yapının oluşmasına ve konuyla ilgili yapılacak başka çalışmaların şekillenmesine katkı sağlamaktır.

Çalışma özellikle endüstriyel uygulamaya yansıtılabilirlik dikkate alınarak hazırlandığı için zeytin ağacının yetiştiği yörelerde bilhassa katma değer sağlayacaktır. Çünkü genellikle budama mevsimi kesilen zeytin dalları yapraklarıyla beraber yakılmaktadır veya öylece bahçede çürümeye terk edilmektedir. Bu çalışma bunların yakılması veya çürümeye terk edilmesi yerine çay, ekstrakt v.b. ürünlere işlenmesini, işlenme kalitesinin artırılmasını teşvik etmesiyle zeytin yaprağına katma değer sağlamaktadır. Zeytin yaprağının kurutulmasıyla fenolik madde dağılımı ve antioksidan kapasitesi ile ilgili bazı çalışmalar mevcut olmasına karşın, bu çalışmalarda farklı kurutma yöntemlerinin fenolik madde dağılımı ile antioksidan kapasiteyi nasıl etkilediğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca tıp ve kozmetik sanayilerinde kullanımının yaygınlaştırılmasına da katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

## 1.6 Literatür Özeti

Bouaziz ve Sayadi (2005) Chemlali zeytin çeşitinin yapraklarındaki fenolik bileşenlerin 2003 Temmuz'dan 2004 Mart'a kadar değişimini kantitatif ve kalitatif olarak belirledikleri çalışmada; oleuropeinin her zaman majör fenolik bileşen olduğunu, bunun dışında luteolin 7-*O*-glukozid, luteolin 7-*O*-rutinozide, apigenin 7-*O*-glucozide, rutin, luteolin ve apigenin bileşenlerini teşhis ettiklerini bildirmektedir [74]. Harp (2011) Gemlik, Domat, Adana Topağı ve Adana yerli zeytin yapraklarının antioksidan etkilerini belirlediği çalışmasında; taze yeşil yaprakların ve IR ile kurutulmuş yaprakların antioksidan aktivitesini incelemiş, çalışmanın sonucunda IR ile kurutulan yapraklardaki daha iyi korunduğu sonucuna varmıştır [35]. Karakulak (2009) zeytin yaprakları ekstraktının antioksidatif aktivitesine, etüv ve mikrodalga ile kurutmanın, çözücü, sıcaklık ve zaman parametreleri üzerine etkisini incelediği çalışmasında; Dikili yöresinden topladığı örnekleri mikrodalga ve etüvde kurutmuş ve 3 farklı sıcaklıkta (25 °C, 40 °C, 70 °C) ekstraksiyon işlemi uygulayarak fenolik madde içerikli ekstrakt elde etmiştir. Yaptığı değerlendirme sonucu ekstraksiyon işleminin; mikrodalga ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile 40°C'de, 4 saat süre ile gerçekleştirilmesinin uygun olduğunu saptamıştır [74]. Boudhrioua ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada; taze zeytin yapraklarının yeşil renkte, yüksek nem içeriğinde olduğunu ve yaprak çeşidine göre değişen oranda toplam fenol içerdiğini belirlemişlerdir. IR ile kurutmada yapraklardan önemli oranda (%85'ten fazla) nem uzaklaştığı ve kurutmanın kısa sürede gerçekleştiği görülmüştür. Yaprak çeşidi ne olursa olsun IR kurutmanın yaprağın toplam fenol içeriğini ve yaprak rengini önemli oranda etkilediği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, taze zeytin yaprakları ile karşılaştırıldığında kuru zeytin yapraklarındaki toplam fenol içeriğinin arttığı belirlenmiştir. IR ile kurutmanın; taze yaprakların yeşil rengini, parlaklığını koruduğunu rapor etmişlerdir [75]. Erbay ve İçier (22) zeytin yapraklarının kurutulmasında optimum koşulların 51.16 °C ve 1.01 m/s hava hızı ve 298.68 dakika olarak belirledikleri çalışmada; bu optimum koşullarda toplam fenol içeriğini %10.25, antioksidan aktivite kaybını %41.88, son nem içeriğini %6 ve kurutucu etkinliğini %65.5 olarak belirlemişlerdir [76]. Saygın (2009), Ayvalık, Memecik, Gemlik ve Domat zeytin yapraklarında 1 yıl boyunca 3'er ay aralıklarla fenolik madde ve antioksidan kapasite baktığı çalışmada; antioksidan aktivitenin %91,38 (Haziran 2008 Memecik) ile % 73, 86 (Eylül 2007 Gemlik) arasında, fenolik madde

miktarının ise %51,86 ile %11,16 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Çalışmada ayrıca antioksidan aktivite ve yapraklardaki toplam fenolik madde miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ) belirlemiştir [32]. Garcia ve Alcaide (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; taze, dondurularak, açık havada ve 60 ile 100 °C'lik fırınlarda kurutulan zeytin yapraklarının kimyasal bileşimi, sindirim sisteminde ve vücut içinde sindirilebilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada; proteine bağlı taninlerin dondurularak, açık havada ve 60°C'de kurutulan yapraklarda 1.25'ten 0.82 g/kg kuru madde'ye düştüğü görülmüştür. Söz konusu çalışmada toplam taninlerin yalnızca 60°C'de kurutulan yapraklarda 10,0'dan 6.24 g/kg kuru madde'ye azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca vücut içi ham protein sindirilebilirliği; 100°C'de kurutma hariç diğer yöntemlerle % 58'e kadar artmış, dondurularak, açık havada ve 60 °C'de kurutmada bulunan ham protein sindirilebilirlik değerleri arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlenmiştir. Kurutmadan sonra ham protein, 0.46'dan 0.64'e, rumendeki parçalanmamış ham proteinin sindirilebilirliği yalnızca fırında kurutmadan etkilenmiş ve 0.33'ten 0.39'a yükseldiği rapor edilmiştir. Hava ile kurutmanın zeytin yapraklarının besin değerine önemli bir etkisi olmamasına rağmen; uygun, basit ve düşük maliyetli bir sistem olarak zeytin yapraklarının korunmasında uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır [77]. Doğan ve arkadaşları (2010) bazı tıbbi bitkilerin antioksidan, fenolik ve protein içeriklerini araştırdıkları çalışmalarında; bitki çeşidine göre antioksidan aktivitenin, fenolik bileşimin ve protein içeriklerinin değiştiğini, en fazla  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, ferulik ve gallik asit içeriğine sahip türlerin sırasıyla *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Mentha piperita* L. ve *Equisetum hyemale* L.'nin olduğunu, genelde en yüksek antioksidan içeriğe *Equisetum hyemale* L. Türünün sahip olduğunu, bitkilerin  $\alpha$ -tokoferol içerikleri ile gallik asit ve  $\beta$ -karoten ile ferulik asit arasında pozitif korelasyon olabileceğini ve en yüksek fenolik ve protein içeriğine sahip bitki türlerinin ise sırasıyla *Hypericum perforatum* L. ve *Glycyrrhiza glabra* L.'nin olduklarını bildirmişlerdir [78].

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

Bu çalışmada materyal olarak; Gemlik ve Ayvalık olmak üzere 2 farklı zeytin çeşidine ait yapraklar budama zamanı (Ocak-Mart), budanan zeytin dallarından toplanmıştır. Toplanan zeytin yaprakları mikrodalga, infrared, konveksiyonel ısıtıcı ve normal atmosferik şartlar altında olmak üzere dört farklı yöntemle kurutulmuştur. Numunelere ilişkin örnek kodları Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2. 1:** Numunelere ait kodlar

Yapağın Toplandığı Çeşit	Kurutma Şekli	Kod
Ayvalık	Normal Oda Şartları	1N
	Konveksiyonel	1K
	İnfrared	1İ
	Mikrodalga	1M
Gemlik	Normal Oda Şartları	2N
	Konveksiyonel	2K
	İnfrared	2İ
	Mikrodalga	2M

## 2.2 Metot

### 2.2.1 % Nem Tayini

5 gr civarı taze yaprak 105 °C'de sabit tartıma getirilene kadar etüvde kurutularak % nem oranı gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

### 2.2.2 Kurutma ve Ekstrakt Eldesi

İki farklı çeşide ait taze zeytin yaprakları toplandıktan sonra toz v.b. kirlerinden arındırılmak amacıyla bir kevgir içine alınarak saf su ile yıkanmıştır. Normal oda şartlarında kurutulan örnekler laboratuarda temiz bir tezgah üstünde 3 günde, etüv ile 65 °C'de 18 saatte, infrared ısıtıcı (dalga boyu: 50-60 Hz, 2500 Watt) ile 68,5 °C'de (termal kamera: termal imacertesto 881) 15 saatte, mikro dalga (Beko marka) ile 180 Watt'da 10 dk. (5 dk.+5 dk.) kurutulmuştur.

Yapraklardan ekstrakt elde etmek için NAŞ (Normal atmosferik şartlar), MD (mikro dalga), Etüv ve İnfrared şeklinde isimdirilen poşetlerden teker teker 15'er gr alınarak tartılmıştır (Denver Instruments SI-234). Kahve öğütücüsü ile çok küçük parçalara ayrılması sağlanmıştır. Her 15 g numune için 150 mL çözücüden (800 mL metanol ve 200 mL saf su) eklenerek Waring Commercial Blender ile 18 dk. karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler filtre kâğıdından süzülerek vakumlu döner evaporatör ile 40 °C'de metanol uzaklaştırılması ile ekstraktlar elde edilmiştir [74, 79].

### 2.2.3 Folin- Ciocalteu Fenol Reaktif Çözeltisi Hazırlanması

10 mL Folin reaktifi 100 mL'lik volumetrik bir balon jöjeykonularak üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlanır. Folin çözeltisinin günlük taze olarak hazırlanması gerekmektedir [79].

#### **2.2.4 Gallik Asit Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

0,500 g gallik asit 100 mL'lik volumetrik bir balon jöjeye konularak üzerine standardı olan çözeltiden (% 60 metanol-su çözeltisinin standart eğrisi çıkartılmak isteniyorsa % 60'lık metanol-su çözeltisi kullanılır) 10 mL ilave edilerek gallik asit çözdürülür ve üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti buzdolabında saklanır [79].

#### **2.2.5 Sodyum Karbonat Çözeltisinin Hazırlanması**

7,5 g sodyum karbonat 100 mL'lik volumetrik bir balon jöjeye konurak bir miktar saf su ile çözülür. Çözelti 100 mL'ye tamamlanır [79].

#### **2.2.6 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) Reaktifinin Hazırlanması**

0,024 g 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) reaktifi 100 mL'lik bir balon jöjeye konurak bir mikrat metanol ile çözülüdükten sonra metanolle 100 mL'ye tamamlanır. DPPH reaktifi çözeltisinin günlük taze olarak hazırlanması gerekmektedir [79].

### **2.3 Toplam Fenolik Madde Analizi**

Zeytin yapraklarındaki toplam fenolik madde analizi için modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır [20]. Fenolik bileşikler, Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler, bu yüzden ortam sodyum karbonat (% 5-10) ile bazikleştirilir.

Tayin edilecek ekstraktan 0,1 mL alınarak üzerine 9,9 mL kendi çözeltisinden eklendikten sonra 1:100 oranında seyreltilir. Hazırlanan bu seyreltik örnek çözeltisinden bir deney tüpüne 0,3 mL alınarak üzerine 1,5 mL taze hazırlanmış folin reaktifi çözeltisi ilave edilir. Vorteks ile iyice karıştırılarak, 8,5 dakika karanlık ortamda bekletilir. Kararıktan çıkarılan her bir tüpe üzerine 1,2 mL, % 7,5'luk

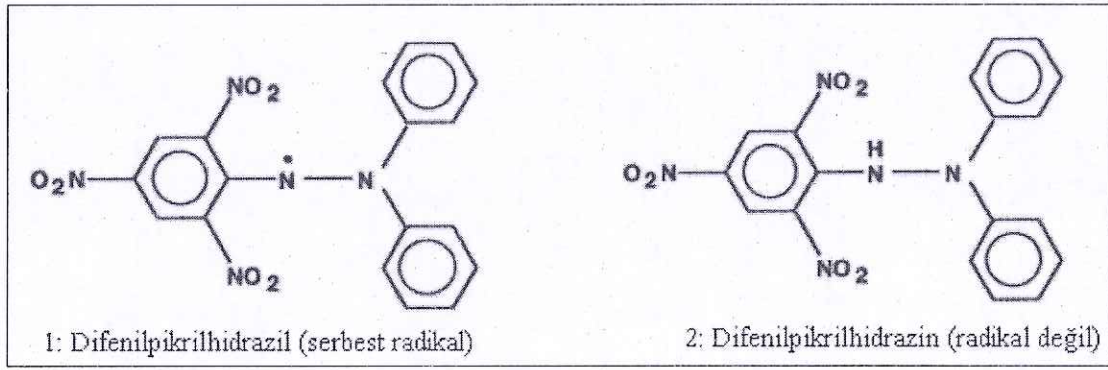
sodyum karbonat çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Karıştırılan örnekler 1,5 saat süre ile karanlıkta bekletilir. 1,5 saat sonra karanlıktan çıkarılan örneklerin hiç bekletilmeden spektrofotometre ile 765 nm'deki kör kabul edilen kuyucuk olan distile suya karşı absorpsiyon değerleri okunur [79].

### 2.3.1 Gallik Asit Standart Eğrisinin Hazırlanması

Daha önce hazırlanan gallik asit stok çözeltisinden 0- 0,2- 0,4- 0,6- 0,8- 1,0- 1,5 ve 2,0 mL alınarak 100 mL'lik volumetrik balon jöjelere konulur. Üzerleri standart eğrisi çıkarılmak istenen çözücü ile 100 mL'ye tamamlanır. Böylece sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 mg/L gallik asit içeren çözeltiler elde edilir. Hazırlanan gallik asit çözeltilerinden deney tüplerine 0,3 mL alınarak üzerlerine 1,5 mL folin reaktifi çözeltisi eklenir ve iyice karıştırılır. 8,5 dk. karanlıkta bekletilir. Karanlıktan alınan tüplerin her birinin üzerine 1,2 mL, %7,5'lük sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek tekrar karıştırılır ve 1,5 saat süre ile karanlıkta bekletilir. Bu süre sonunda karanlık ortamdan alınan tüpler hemen 765 nm'de köre karşı absorpsiyon değerleri okunur [79].

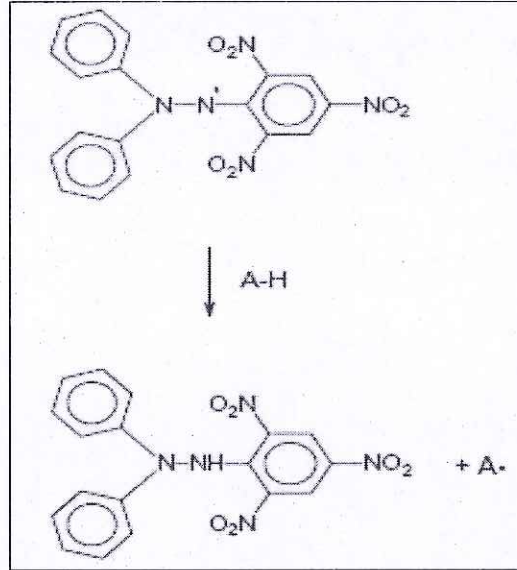
### 2.4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Bu yöntem temel olarak, metanol yada etanol de hazırlanan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal çözeltisi üzerine antioksidan bileşiğinin eklenmesi sonucu organik nitrojen radikal çözeltisinin renginde meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi, elektron spin rezonans (ESR) veya daha çok kullanılan dekolorizasyon yöntemi ile değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. DPPH radikali 515-517nm dalga boyunda kuvvetli bir absorpsiyon göstermekte bu durum çok net gözlemlenebilmektedir. DPPH radikal çözeltisi, antioksidan aktiviteye sahip ekstrakt ile karıştırılınca, antioksidan bileşik ortama bir hidrojen atomu vermek suretiyle stabil, radikal olmayan DPPH formuna dönüşmekte, bu dönüşüm sırasında eş zamanlı olarak yoğun mor renk (DPPH) kaybolmakta ve indirgenme sonucu sarı renk (DPPH) oluşmaktadır [80]. Şekil 1.1'de DPPH'in moleküler yapısı ile Şekil 2'de bu reaksiyon kısaca gösterilmektedir.



Şekil 2. 1: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı[81].

Aşağıda Şekil 2.1'de DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu gösterilmektedir.



Şekil 2. 2: DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu [81].

Spektrofotometrik analiz için örneklerden üçer, kontrol çözeltilerinden ise ikişer adet paralel çözeltiler kullanılmıştır. 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbanlardan aşağıdaki formül yardımıyla örneklerin DPPH radikali yakalama aktiviteleri, dolayısıyla antioksidan aktiviteleri hesaplanmıştır [76].

$$\text{Antioksidan Aktivite (\%)} = [1 - (\text{örnek absorbanı} / \text{kontrol absorbanı})] \times 100$$

## 2.5 HPLC ile Fenolik Madde Dağılımı Analizi

Bu çalışmada Doğan ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada kullanılan yöntemden yararlanılmıştır. Analizlerde Perkin Elmer 200 series Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için Macherey-Nagel EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C-18 kolon kullanılmıştır. Yaprak ekstraktında bulunan fenolik maddelerin analizi için ekstrakt, 5 gr örnek 3 defa 15 mL saf su/metanol (20:80) karışımında çözülmüştür. Daha sonra çözücü 35°C'de evaporatör yardımıyla uzaklaştırılarak ve tartım işlemi yapılmıştır. Örneklerin her birine saf su/metanol (20:80)'den 5 mL ilave edilmiş ve örnekler HPLC ile analiz edilmiştir [78].

**Tablo 2. 2:** HPLC şartları

Standartlar	Dalga boyu	Saf Su (0.10-fosforik asit)	Asetonitril
Oleuropein	280	% 50	% 50
Kafeik asit	280	% 50	% 50
Vanilik asit	280	% 70	% 30
Kuersetin	360	% 65	% 35
Rutin hidrat	280	% 70	% 30
7-Luteolin glikozit	350	% 65	% 35
Tirosol	280	% 30	% 70

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Yaprak Örneklerinin Kuru Madde Oranlarına İlişkin Bulgular

Farklı yöntemlerle kurutulan zeytin yaprağı örneklerinin kuru madde oranlarına ilişkin sonuçlar Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3. 1:** Kuru Madde Oranları (%)

	Ayvalık	Gemlik
<b>Kuru madde oranı</b>	72.66	73.00

#### 3.2 Toplam Antioksidan Aktivite Analizine İlişkin Bulgular

Farklı yöntemlerle kurutulmuş zeytin yapraklarının antioksidan aktivite analizlerine ilişkin sonuçlar Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3. 2:** Antioksidan Aktivite (%)

	Normal Oda Şartları	Konveksiyonel	İnfrared	Mikrodalga
<b>Ayvalık</b>	82.76	88.48	90.36	92.76
<b>Gemlik</b>	92.76	89.76	92.95	93.42

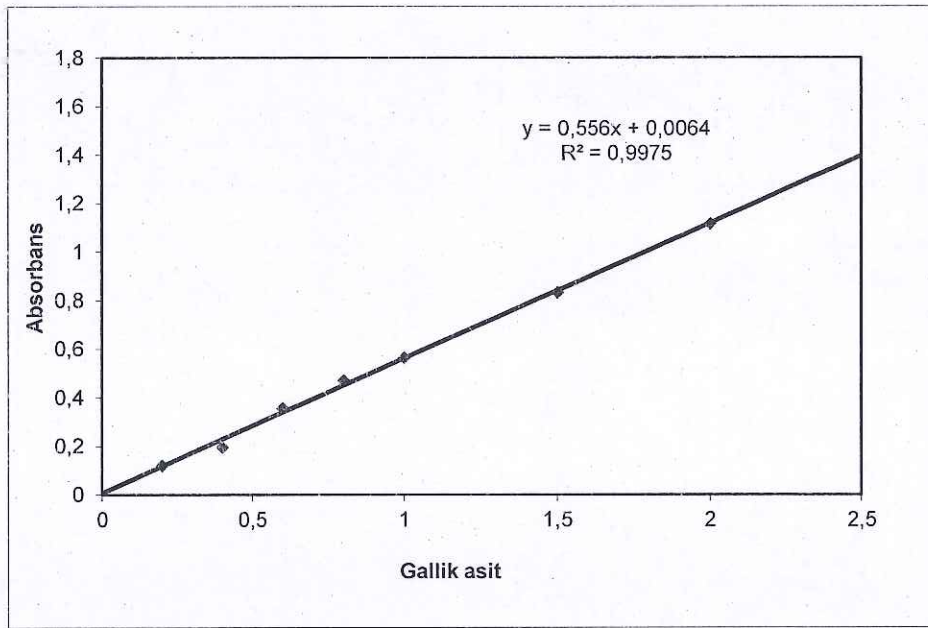
#### 3.3 Toplam Fenolik Madde Analizine İlişkin Bulgular

Ayvalık ve Gemlik zeytin çeşitlerinin farklı yöntemlerle kurutulmuş zeytin yapraklarının toplam fenolik madde analizlerine ilişkin sonuçlar Tablo 3.3’de verilmiştir.

**Tablo 3. 3:** Toplam Fenolik Madde (mg/100 g)

	Normal Oda Şartları	Konveksiyonel	İnfrared	Mikrodalga
<b>Ayvalık</b>	301.09	305.47	274.83	409.88
<b>Gemlik</b>	275.75	200.76	165.18	301.67

Zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmış ve gallik asidin standart olarak kullanıldığı eğri Şekil 3.1 de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 1:** Zeytin yapraklarının toplam fenol içeriğinin hesaplanmasında kullanılan gallik asit standart eğrisi

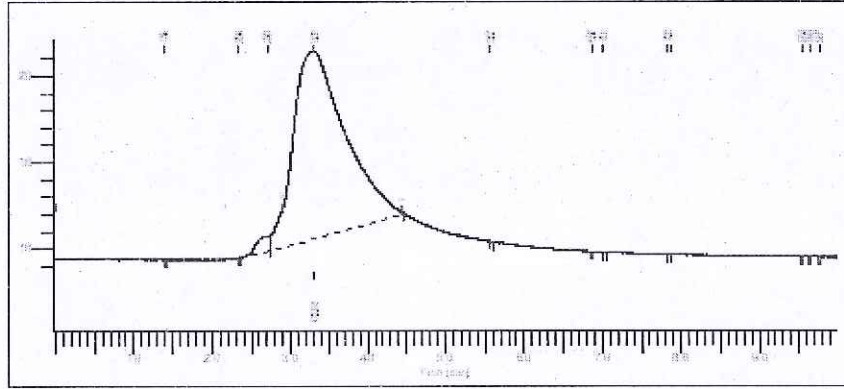
### 3.4 Fenolik Madde Dağılımı Analizine İlişkin Bulgular

Farklı yöntemlerle kurutulmuş zeytin yapraklarının fenolik madde dağılımı analizlerine ilişkin sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir.

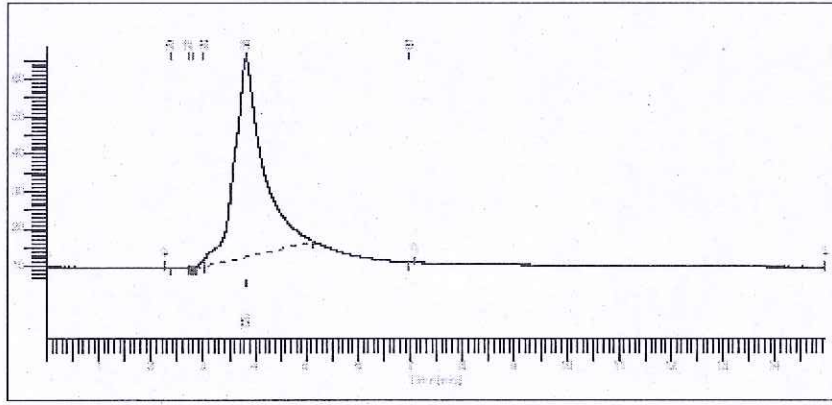
**Tablo 3. 4:** Fenolik Madde Dağılımı (mg/100 gr)

		Oleuropein	Lüteolin 7-glukozid	Tirosol	Kafeik asit	Vanilikasit	Rutin hidrat	Kuersetin
AYVALIK	NŞ	11753	8	238	55	-	31	5
	K	14273	12	28	6	-	38	13
	IR	7233	50	28	53	-	35	6
	M	17658	16	83	6	-	43	5
GEMLİK	NŞ	11485	7	225	55	-	31	4
	K	9263	10	20	48	-	33	3
	IR	11078	16	38	36	-	33	4
	M	17698	40	78	5	-	40	6

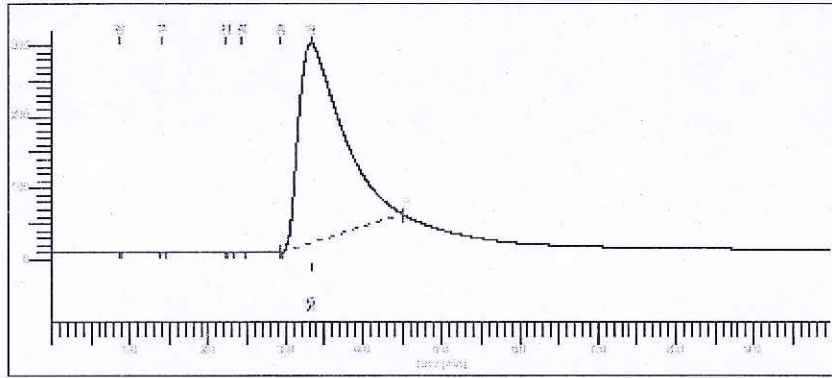
Fenolik standart maddelerine ilişkin HPLC pikleri sırasıyla Şekil 3.2-Şekil 3.8 de verilmiştir.



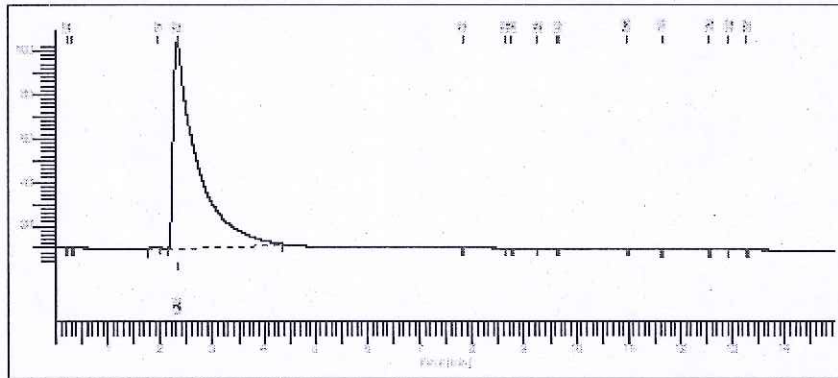
**Şekil 3. 2:** Oleuropeinin standart HPLC piki (3.30 dk.)



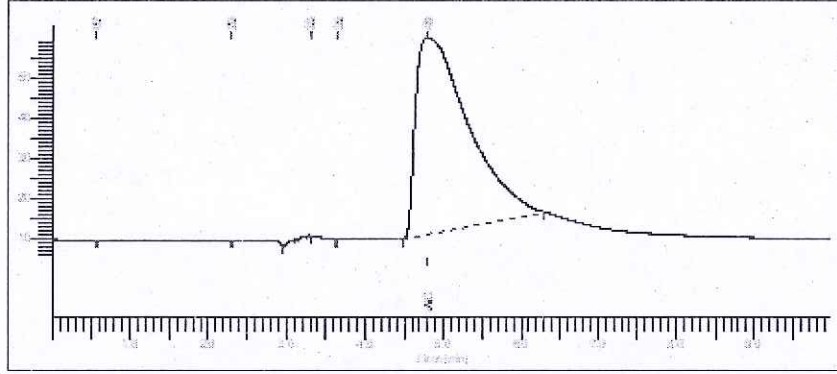
Şekil 3. 3: Luteolin-7 glikozitin standart HPLC piki (3.81 dk.)



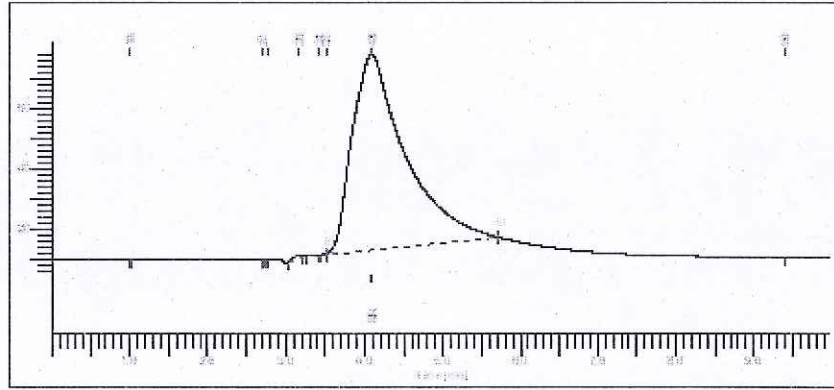
Şekil 3. 4: Tirozolün standart HPLC piki (3.32dk)



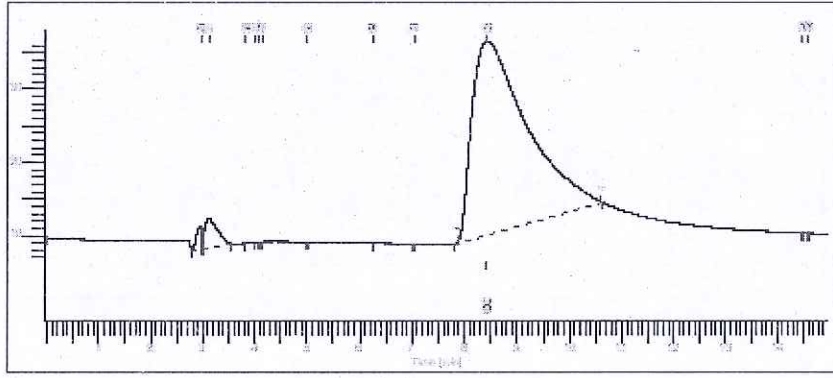
Şekil 3. 5: Kafeik asitin standart HPLC piki (2.32 dk.)



Şekil 3. 6: Vanilik asidin standart HPLC piki (4.78 dk)

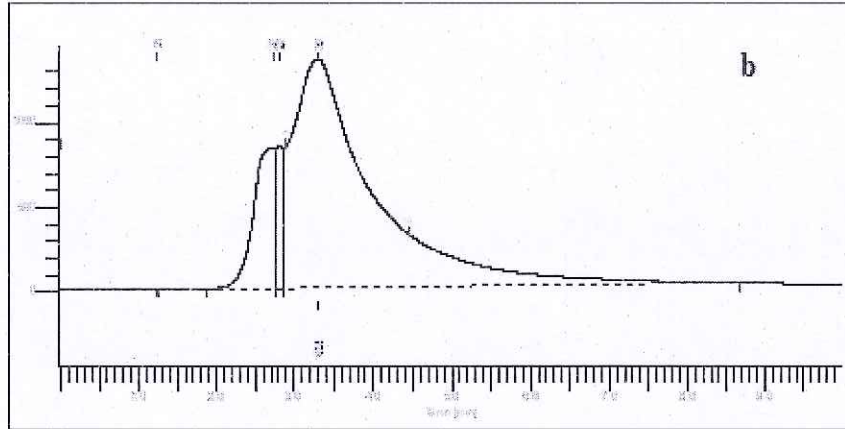


Şekil 3. 7: Rutin hidratın standart HPLC piki (4.08 dk)

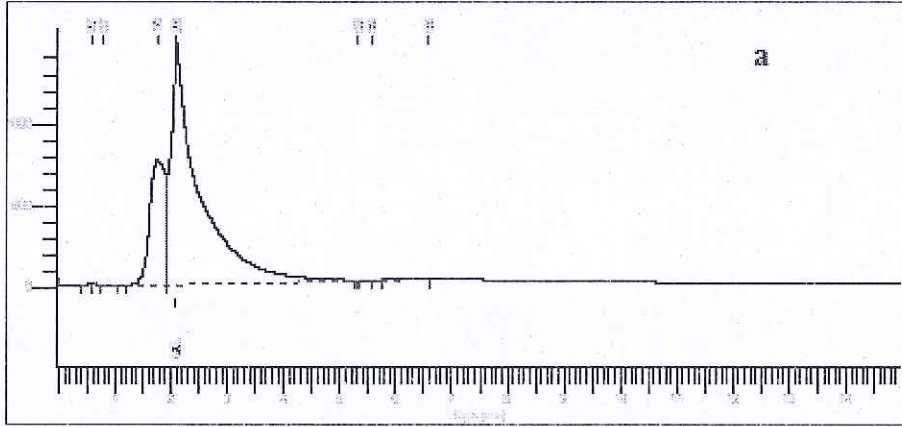


Şekil 3. 8: Kuersetinin standart HPLC piki (8.43 dk)

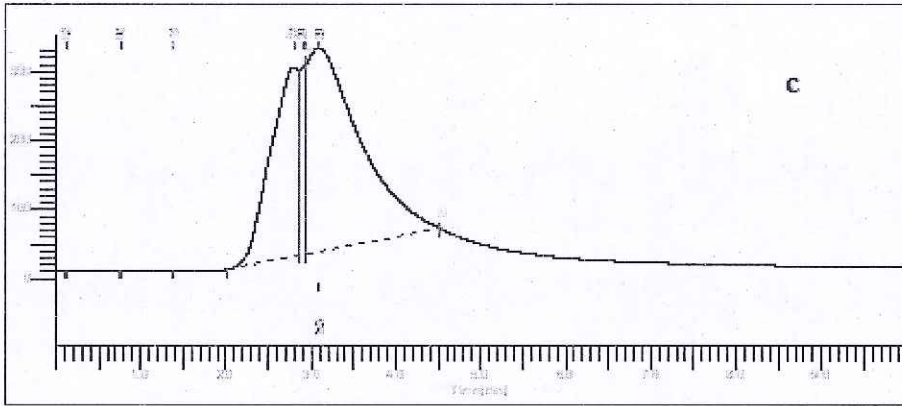
Çalışmada kullanılan numunelerin HPLC piklerine ilişkin bazı örnekler (Ayvalık çeşidi zeytin yapraklarının mikrodalga ile kurtulmasından elde edilenlerden) Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmiştir.



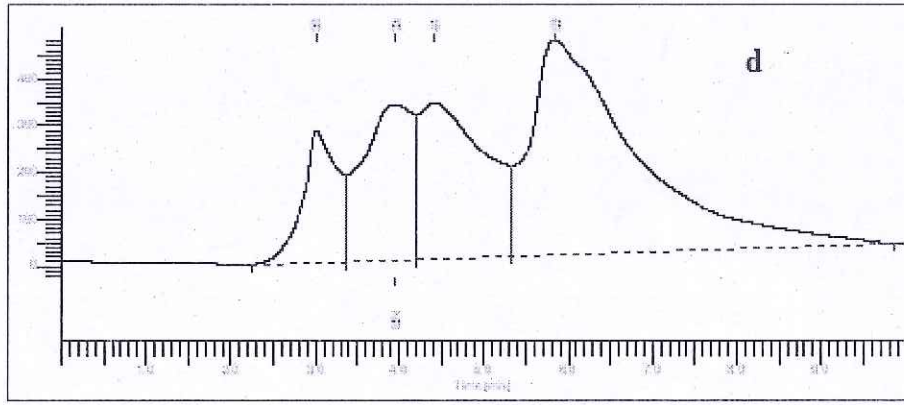
Şekil 3. 9: Oleuropein piki



Şekil 3. 10: Kafeik asit piki



Şekil 3. 11: Tirozol piki



Şekil 3. 12: Rutin hidrat piki

#### 4. SONUÇ TARTIŞMA

Bu çalışmada, Ayvalık ve Gemlik zeytin ağaçlarından toplanan yapraklar farklı şartlarda kurutulmuş, içermiş olduğu fenolik bileşiklerin, antioksidan aktivitenin ve toplam fenolik maddenin nasıl değiştiği belirlenmeye çalışılmıştır. Farklı iki çeşit olan ayvalık ve gemlik zeytin ağaçlarından elde edilen yaprakların hem antioksidan aktivitesi hem de içerdikleri fenolik bileşikler karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmaya ait bulgular ile literatürde zeytin yaprağı ve fenolik bileşikler ile ilgili yapılan diğer çalışmalara ait bulgular karşılaştırılmıştır.

Ekstraksiyon seçimi, zeytin yapraklarının sahip olduğu antioksidan aktivite ve içerdikleri fenolik bileşiklerin tayini için çok önemlidir. Bu yüzden yapılan literatür taramalarında en iyi saflaştırma yöntemi baz alınarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Ekstraksiyon seçiminde metanollü çözeltiler etanole oranla daha iyi sonuçlar vermesinden dolayı saf su/metanol (20/80) tercih edilmiştir. Bu düşünce daha önceki yapılan çalışmalara paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen antioksidan aktiviteye ilişkin sonuçlar Tablo 3,2’de verilmiştir. Bu verilere göre en yüksek antioksidan aktivitenin hem Ayvalık hem de Gemlik zeytin yaprağında mikrodalga kurutma yöntemi ile kurutulan örneklerde olduğu belirlenmiştir. Tablo 3,2’de verilen kurutma yöntemlerine göre antioksidan aktivitenin sırasıyla; mikrodalga, infrared, konveksiyonel ve normal şartlarda kurutma yöntemleri olduğu görülmektedir.

Fenolik maddeler genel olarak bitkisel antioksidatif etkili bileşiklerdir. Bir bitkide bulunan toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesi hakkında fikir vermesi bakımından önem taşımaktadır. İki türe ait yapraklardaki toplam fenolik madde içeriklerinin kurutma yöntemine göre değiştiği tespit edilmiştir. Tablo 3.3’te belirtildiği gibi mikrodalga ile kurutma yönteminde toplam fenolik içeriğin en yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonucu konveksiyonel, normal şartlarda ve infrared ile kurutma yöntemleri takip etmektedir. Elde edilen deneysel verilere göre, Ayvalık zeytin yapraklarının Gemlik zeytin yapraklarından daha yüksek konsantrasyonda fenolik madde içeriğine ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

HPLC ile fenolik bileşim analizlerine bakıldığında birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Her bir fenolik bileşik aynı ekstraksiyon yöntemi sonrası HPLC'ye enjekte edilmiştir. Her bir standart fenolik bileşik için farklı kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Böylece ekstraktlardaki net miktara yakın bir değer elde edebileceği düşünülmüştür. Tablo 3.4'e bakıldığında, Ayvalık ve Gemlik zeytin çeşitlerinin yapraklarında, oleuropein ve rutin hidrat mikrodalga ile kafeik asit ve tirosolün normal şartlar ile luteolin 7-glikozitininfrared ile, kuersetinin ise konveksiyonel kurutma yöntemi ile en yüksek miktarlarda tespit edildiği görülmektedir. Harp (2011), Gemlik, Domat, Adana Topağı ve Adana yerli zeytin yapraklarının antioksidan aktivitelerini belirlemeye çalıştığı araştırmasında; taze yeşil yaprakların ve IR ile kurutulmuş yaprakların antioksidan aktivitesini incelemiş ve IR kurutma yöntemi sonucunda aktivitenin daha iyi korunduğu sonucuna varmıştır [35]. Karakulak (2009) zeytin yapraklarından antioksidan eldesinde, etüv ve mikrodalga ile kurutmanın, çözücü, sıcaklık ve zaman parametreleri üzerine etkisini incelediği çalışmasında; Dikili yöresinden topladığı örnekleri mikrodalga ve etüvde kurutmuş ve üç farklı sıcaklıkta (25°C, 40°C, 70°C) ekstraksiyon işlemi uygulayarak fenolik madde içerikli ekstraktlar elde etmiştir. Yaptığı değerlendirme sonucu ekstraksiyon işleminin; mikrodalga ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile 40°C'de, 4 saat süre ile gerçekleştirilmesinin uygun olduğunu bildirmiştir [79]. Karakulak (2009)'ın elde ettiği sonuçlar bizimkiler ile oldukça benzerlik göstermektedir. Boudhrioua ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada; taze zeytin yapraklarının yeşil renkte, yüksek nem içeriğinde olduğu ve yaprak çeşidine göre değişen oranda toplam fenol içeriğini belirlemişlerdir. IR ile kurutmada yapraklardan önemli oranda (% 85'ten fazla) nem uzaklaştığı ve kurumanın kısa sürede gerçekleştiği görülmüştür. Yaprak çeşidi ne olursa olsun IR kurutmanın yaprağın toplam fenol içeriğini ve yaprak rengini önemli oranda etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, taze zeytin yaprakları ile karşılaştırıldığında kuru zeytin yapraklarındaki toplam fenol içeriğinin arttığı belirlenmiştir [79]. Erbay ve İçier (2009) zeytin yapraklarının kurutulmasında optimum koşulların 51.16 °C ve 1.01 m/s hava hızı ve 298.68 dakika olarak belirledikleri çalışmalarında; optimum koşullarda toplam fenol içeriğini % 10.25; antioksidan aktivite % 41.88; son nem içeriği % 6 ve kurutucu etkinliği % 65.5 olarak tespit etmişlerdir [76]. Saygın (2009) Ayvalık, Memecik, Gemlik ve Domat zeytin çeşitlerine ait yapraklarda bir yıl boyunca üçer ay aralıklarla fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite değişimini araştırdığı çalışmasında; antioksidan

aktivitenin % 91,38 (Haziran 2008, Memecik) ile % 73,86 (Eylül 2007, Gemlik) arasında, fenolik madde miktarının ise % 51,86 ile % 11,16 arasında değiştiğini belirlemiştir. Ayrıca antioksidan aktivite ve yapraklardaki toplam fenolik madde miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığını ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) rapor etmiştir [32]. Garcia ve Alcaide (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmaya göre; taze, dondurularak, açık havada, 60 °C ve 100 °C'lik fırınlarda kurutulan zeytin yapraklarının kimyasal bileşimi, sindirim sisteminde ve vücut içinde sindirilebilirliği araştırılmıştır. Açık havada kurutulan zeytin yapraklarının besin değerinde önemli bir değişme olmamasına rağmen; uygun, basit ve düşük maliyetli bir sistem olarak zeytin yapraklarının korunmasında uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır [77]. Hayes ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada ticari olarak elde ettikleri zeytin yaprağı ekstraktında, lutein, sesamol ve ellagicasitin DPPH, ABTS, FRAP, ORAC ve  $\beta$ -karoten-linoleik asit yöntemlerini kullanarak *in vitro* şartlardaki antioksidan özelliklerini belirlemeye çalışmışlardır. Tüm metodlar için antioksidan gücü ellagic asit >sesamol>zeytin yaprağı ekstraktı> lütein şeklinde sıralandığı belirlenmiştir. Hayes ve arkadaşları zeytin yaprağı ekstraktının toplam fenolik içeriğini Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak 1.60 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/ g zeytin yaprağı ekstraktının kuru ağırlığı olarak tespit etmişlerdir. Diğer taraftan yine aynı çalışmada zeytin yaprağı ekstraktında HPLC-DAD analiziyle daha önce tanımlanmış fenolik bileşikler olan oleuropein, verbaskozid, hidroksitirasol, tirasol, apigenin-7-O-glukozid ve lüteolin-7-O-glukozidin tayinleri de yapılmıştır [82]. Benavente-Garcia ve arkadaşları (2000) *O. europaea* L. yapraklarında bulunan çeşitli polifenollerini belirlemişlerdir. Bu bileşiklerden hidroksitirazol % 1.5, lüteolin-7-glukozid % 1.4, apigenin-7-O-glukozid % 1.4, verbaskozid % 1.1, tirasol % 0.7 fraksiyonlarındayken oleuropeinin ise % 24.5'lik fraksiyon ile en yüksek seviyede olduğu saptanmıştır [36]. Pereira ve arkadaşları da (2007) liyofilize zeytin yaprağı ekstraktlarında oleuropein lüteolin-7-O-glukozidin en çok bulunan fenolik bileşikler olduğunu bildirmişlerdir [83]. Bilgin ve Şahin (2013) zeytin yapraklarını orijinal yöntemler olan HAE (Homojenleştirici destekli ekstraksiyon) ve UAE (ultrason destekli ekstraksiyon) fenol ile ekstrakte etmişlerdir. Bursa, Mardin, Ayvalık, Kaş, Tekirdağ ve Çanakkale'de yetişen zeytinlerden toplanan yapraklarda metanol ekstraktında toplam fenol içeriğini gallik asit eşitliğinden yararlanılarak tespit edilmiştir. HAE ekstraktının verimi 102.27 den 443.16 mg/g kuru yaprak olarak çeşitlenmiştir. Yapraklarda toplam polifenol içeriği 10.11-61.66 mg gallik asit/g kuru

yaprak arasında değiştiği belirlenmiştir. UAE'ye göre 88.75 -350.82 mg/g kuru yaprak arasındayken toplam fenol içeriğinin 7.35 -38.66 mg gallik asit/g kuru yaprak arasında olduğu görülmüştür [84]. Floch ve arkadaşları (1998)yüksek selektif süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) yöntemi ile zeytin yapraklarındaki fenol bileşiklerinin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Total fenol içeriği Folin-Ciocalteu metodu ile tespit edilmiştir. SFE metodu ile zeytin yaprağındaki fenol içeriğinin n-hegzan için  $0.18 \pm 0.03 \text{ mg/g}^{-1}$ , dietil eter için  $1.1 \pm 0.3 \text{ mg/g}^{-1}$ , etil asetat için  $1.6 \pm 0.4 \text{ mg/g}^{-1}$ , metanol için  $16.8 \pm 0.8 \text{ mg/g}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2 + \%10$  metanol için  $7.6 \pm 0.5 \text{ mg/g}^{-1}$  konsantrasyonlarında olduğunu belirlemişlerdir [85]. Bouaziz ve Sayadi (2005) yaptıkları çalışmada zeytin ağacı yapraklarındaki majör fenolikleri 2003 yılı haziran ayı ile 2004 mart ayları arasında, oleuropein, lüteolin 7-glikozit, lüteolin 7-rutinozit, apigenin 7-glikozit, glikozit, rutin, lüteolin ve apigenin olmak üzere sekiz fenolik bileşenini belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmada en yüksek orana sahip bileşenin oleuropein olduğu bildirilmektedir. Bulunan fenolik bileşenlerin bir kısmı (Oleuropein, lüteolin 7-glukozid, rutin hidrat) bizim çalışmamızla paralelik göstermekte olup bir kısmı ise bizim bulduğumuz bileşenlerden (tirosol, kafeik asit, vanilik asit, kuarsetin) farklılık göstermektedir. Yine hakim fenolik bileşenin oleuropein olması bakımından yaptığımız çalışmaya paralellik arz etmektedir [74]. Ok-Hwan Lee ve Boo-Yong Lee (2010) Tarımsal atık olarak değerlendirilen zeytin yaprağının, doğal antioksidan aktivite açısından büyük bir potansiyele sahip olduğu belirttikleri bir çalışmada [86]; zeytin yaprağının antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin yanında bir de bu özelliklerin fenollerle kombinasyonu araştırmışlardır. Kombinasyonlu ya da tek başına araştırılan her iki durumda da elde edilen veriler ortak olup iyi bir radikal süpürücü aktivite (DPPH) ve süperoksit dismutaz (SOD) (Speroksidin hidrojen peroksite dönüşmesini katalize eden antioksidan bir enzim) gibi aktiviteleri ortaya çıkardığı belirtilmektedir. Ayrıca araştırmanın sonuçları arasında antimikrobiyal aktivite, oleuropein ve kafeik asit gibi fenolik bileşiklerle birlikte kombine olduğunda mikroorganizmaları tutma etkisinin olduğu, kombine olunan durumlarda antimikrobiyel aktivitelerinin daha da arttığı kaydedilmektedir. Çalışmada, Gray ve Dugan (1975)'nin metodu tarafından tanımlanan Nitrik-Atma yeteneği ile 500  $\mu\text{M}$  ile 1000  $\mu\text{M}$  arasında belirlenen fenolik bileşikler ve değerleri sırasıyla; oleuropein (% 72.7- % 86.8), rutin (% 47.8-% 88.1), vanilin (% 6.3-% 11.3), kafeik asit (% 92.2-% 97.8) ve kombine edilmiş durumda (% 66.6-% 84.8) olduğu belirtilirken; DPPH yöntemi ile 50  $\mu\text{M}$ 'da bulunan fenolik bileşik değerleri; oleuropein (% 55.0),

fenolik karışım ve rutin (% 58.1), vanilin (% 5.8), kafeik asit (% 85.7) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Son olarak da süperoksit dismutaz (SOD) yöntemi ile 500 µM da bulunan fenolik bileşik değerleri; oleuropein (% 89.8), rutin (% 103.4), vanilin (% 28.8), kafeik asit (% 106.8) ve kombine edilmiş durumda (% 86.4) bulunduğu belirtilmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada HPLC ile bulunan fenolik bileşik değerlerinden (Tablo 3. 4: Fenolik Madde Dağılımı (mg/100gr)) oleuropeinin yüksek çıkması Ok-Hwan Lee ve Boo-Yong Lee (2010) nin yaptığı çalışmaları arasında paralellik olduğunu göstermektedir. Ranelli ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada farklı hasat dönemlerine ait zeytin yapraklarındaki oleuropein miktarlarının genetik faktörlerin etkisiyle önemli oranda değiştiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada yedi farklı zeytin ağacı türünün mart ve ekim aylarında yeşil, yeşil-sarı ve sarı yaprak örneklerinin oleuropein miktarları belirlenmiş olup mart ayında yeşil yaprak örnekleri için  $2,24 \pm 0,76$ - $8,55 \pm 0,71$  gr/kg taze yaprak, yeşil-sarı yaprak örnekleri için  $1,36 \pm 0,09$ - $5,55 \pm 0,38$  gr/kg taze yaprak, sarı yaprak örnekleri için  $0,90 \pm 0,07$ - $3,62 \pm 0,18$  gr/kg taze yaprak aralığında; ekim ayında ise yeşil yaprak örnekleri için  $2,05 \pm 0,14$ - $8,04 \pm 0,60$  gr/kg taze yaprak, yeşil-sarı yaprak örnekleri için  $1,30 \pm 0,07$ - $5,11 \pm 0,35$  gr/kg taze yaprak, sarı yaprak örnekleri için  $0,78 \pm 0,06$ - $3,27 \pm 0,18$  gr/kg taze yaprak aralığında saptanmıştır. Çalışmada genel olarak oleuropein miktarı bakımından mart ayı numunelerinin daha zengin içeriğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca renk itibariyle de sarı ve yeşil-sarı renkli yapraklarının oleuropein miktarının düşük olduğu da belirtilmiştir [87]. Yapmış olduğumuz çalışmada bu çalışmadan farklı olarak çeşitler arası oleuropein miktarı değişiminin bu çalışmadaki kadar önemli ve büyük olmadığı görülmektedir.

Bir araştırmada, radikal süpürücü aktivite değerlendirilmesinde toplam flavonoidler araştırmanın %13-27 oranında kullanıldığı bölümde lüteolin 7-o glukozid baskın bir radikal süpürücü ve akışkanlık özellik göstermesinden dolayı önemli fenolik bir bileşik olduğu da bulgular arasında belirtilmektedir [88]. Lee ve arkadaşları (2009) uygun bir ekstrakt yöntemi seçmenin bioaktif içeriğinin artmasında önemli bir unsur olduğunu belirttikleri çalışmada, aynı zamanda kullanılan çözücülerinde önemli etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir [89].

Çalışmamızda örneklerin antioksidan aktivitelerinin % 82.76 (1N)-% 93.42 (2M), toplam fenolik madde miktarlarının ise  $165.18$  mg/100 g (2İ)- $409.88$  mg/100 g (2M) arasında değiştiği saptanmıştır. Genel olarak zeytin yapraklarının kurutma

yöntemine göre antioksidan aktivitelerini; “mikrodalga > infrared > konveksiyonel > normal şartlar” şeklinde, zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarlarını kurutma yöntemlerine göre; “mikrodalga > konveksiyonel > normal şartlar > infrared” şeklinde değişim gösterdiği görülmüştür. Çalışmada teşhis edilen başlıca fenolik bileşenler; oleuropein, luteolin 7-glukozit, tirozol, kafeik asit, rutin hidrat ve kuersetindir. Bütün örneklerdeki hakim fenolik bileşenin oleuropein (7233 mg/100 gr (1İ)- 17698 mg/100 gr (2M)), örneklerin genelinde en zayıf bileşenin ise kuarsetin (3 mg/100 gr (2K) -13 mg/100 gr (1A)) olduğu belirlenmiştir. Genel olarak literatür çalışmaları incelendiğinde bitkilerdeki fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasında önemli bir korelasyon olduğu görülmektedir. En yüksek toplam fenolik madde içeriğinin mikrodalga olduğu yöntemde aynı zamanda antioksidan aktivitenin de en yüksek olduğu belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yapılan çalışmada, kurutma yöntemlerinin antioksidan aktiviteye etkisi bakımından bir sıralama yapılması halinde en yüksek antioksidan aktiviteyi mikrodalga yöntemiyle kurutulan zeytin yapraklarının gösterdiği saptanmış olup, bunu sırasıyla infrared kurutma, konveksiyonel kurutma ve normal oda koşullarında kurutma yöntemi takip etmektedir. Araştırmanın sonuçlarına göre kurutma yöntemi ve antioksidan aktivite yüksekliği bakımından; “mikrodalga > infrared > konveksiyonel > normal oda koşulları” şeklinde bir sıralama yapmak antioksidan aktiviteye kurutma yönteminin etkisini kısaca göstermektedir.
- Kurutma yöntemlerinin toplam fenolik madde miktarlarına etkisi bakımından bir sıralama yapılması halinde en yüksek fenolik madde miktarı mikrodalga yöntemiyle kurutulan zeytin yapraklarında tespit edilmiş olup bunu sırasıyla konveksiyonel kurutma, normal oda koşullarında kurutma ve infrared kurutmanın takip ettiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kurutma yöntemi ve toplam fenolik madde miktarı bakımından; “mikrodalga > konveksiyonel > normal oda koşulları > infrared” şeklinde bir sıralama yapmak toplam fenolik madde miktarına kurutma yönteminin etkisini özetlemektedir.
- Araştırmanın bulgularına göre oleuropein ve rutin hidrat bileşenlerinin saptandığı en yüksek konsantrasyonların mikrodalga yöntemi ile kurutulan zeytin yaprağı numunelerinde, en yüksek luteolin 7-glukozit konsantrasyonunun infrared yöntemiyle kurutulan zeytin yaprağı numunelerinde, en yüksek tirozol ve kafeik asit konsantrasyonunun normal oda koşullarında kurutulan zeytin yaprağı numunelerinde ve en yüksek kuesetin konsantrasyonunun ise konveksiyonel kurutma yöntemi ile kurutulan zeytin yaprağı numunelerinde olduğu belirlenmiştir.
- Çalışmanın önemli bir sonucuda genel olarak Ayvalık çeşiti zeytin yaprağı numunelerinin, Gemlik çeşiti zeytin yaprağı numunelerine göre daha yüksek konsantrasyonda fenolik madde içermesi ve daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunun tespit edilmiş olmasıdır.

Tüm bu sonuçlar ışığında; zeytin ağacı yapraklarının endüstriyel uygulamalarla zeytin yaprağı çayı hazırlanmak üzere tüketici ambalajlarına doldurulması sürecinde, hammadde olarak Ayvalık çeşiti zeytin yapraklarının tercih edilmesi ve bu yaprakların mikrodalga teknolojisi ile çalışan tünel kurutucularda kurutulması, elde edilecek son ürün olan zeytin yaprağı çayının fenolik madde miktarı bakımından zengin ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip olması için önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Ekici, L. ve Sağdıç, O., "Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu", *Gıda*, 33(5), 251-260, (2008).
- [2] Koca, N. ve Karadeniz, F., "Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler", *Gıda*, 30, 229-236, (2005).
- [3] Franzke, C., "AlgemeinesLehrbuch der Lebensmittelchemie", *Hamburg: Behr'sVerlag*, (1998).
- [4] Çavdar, C.,Sifil, A. ve Çamsarı, T., "Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma", *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4, 92-95, (1997).
- [5] Karaca, Ş. ve Güder, H., "Dermatolojide antioksidan sistem", *Türk Dermatoloji Dergisi*, 3, 32-39, (2009).
- [6] Langseth, L., "Oxidants, AntioxidantsandDiseasePrevention", *Belgium: International Life SciencesInstitute*, (1995).
- [7] Gür, E. ve Altuğ, T., "Antioksidanlar", (ed: Altuğ, T.), *Gıda Katkı Maddeleri*, İzmir: Sidas, 17-39, (2009).
- [8] Alan, Ü." Bor Bileşik Ve Minerallerinin Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkileri", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).

- [9] Prior, R. L. and Cao, G. H., "Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review", *Journal of AOAC International*, 83(4), 950-956,(2000).
- [10] Ardağ, A." Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi,*Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü*, Analitik Anabilim Dalı, Aydın, (2008).
- [11] Arıduru, R. ve Arabacı,G., "Çiğertaze otu (*salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi", *SAÜ. Fen Bil. Der.* 17(2), 241-246, (2013).
- [12] Meral, N., Doğan, İ.S., Kanberoğlu Saydan, G., "Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar", *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 2(2), 45-50,(2012).
- [13] Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M., "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962,(1999).
- [14] Nagai, T., Myoda, T. and Nagashima T., "Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (*tsukushi*) *Equisetum arvense*", *Food Chemistry*, 91, 389-39,(2005).

- [15] Özcan, T. "Biyonanoimplantların Biyouyumluluğu" *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2010).
- [16] Diken, M.E. " Bazı şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri", Yüksek Lisans Tezi *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [17] Tetiktabanlar, İ., "Tuz stresinin bezelyede (*Pisum sativum* L.) fenolik bileşikler üzerine etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat, (2011).
- [18] [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phenol\\_chemical\\_structure.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phenol_chemical_structure.png)(erişim tarihi: 23.10.2013)
- [19] İçyer, N.C., "Nar kabuğu fenolik bileşiklerinin su ile ekstraksiyonu ve ekstraktların mikrokapsülasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Kayseri, (2012).
- [20] Çam M., "Basınçlı Solvent Ekstraktörü Kullanılarak Nar Kabuğu ve Çekirdeğinin Antioksidan Bileşiklerin Su ile Ekstraksiyonu", Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2009).
- [21] Salman, Ü., "Lactuca sativa L.'den Elde Edilen Polifenoloksidazın Kısmı Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).

- [22] Nizamoglu, M. N., Nas, S. "Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri". *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 20–35, (2010).
- [23] Selek, İ., "Ceviz ve kestanede bazı fenolik bileşiklerin incelenmesi", *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, (2011).
- [24] Eryılmaz, F., "Bakır (Cu) uygulanmış mısır (Zea mays L.) fidelerindeki antioksidan aktivitelerin fizyolojik ve anatomik yönden incelenmesi", Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2007).
- [25] Toptaş, S., "Etlik bıldırcın karma yemlerine doğal antioksidan olarak zeytin yaprağı ekstraktı ilavesinin besi performansı, etkin yağ asidi bileşimi ve lipid oksidasyonu üzerine etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Zooteksi Anabilim Dalı, Tokat, (2010).
- [26] Baydar, K., "Bazı limon çeşitlerinin (Citrus lemon (L.) Burm. f.) uçkurutan hastalığı (Phoma tracheiphila (Petri) Kanc. et. Ghik.)'na karşı dayanıklılık mekanizmasının fenolik bileşikler bazında değerlendirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, (2010).
- [27] Michalak, A., "Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress". *Polish J. of Environ. Stud.*, 15(4), 523–530, (2006).
- [28] Devi, K.P., Suganthy, N., Kesika, P., and Pandian, S.K., "Bioprotective properties of seaweeds: in vitro evaluation of antioxidant activity and

antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content", *BMC Complement Altern Med.*, 8, 38, (2008).

- [29] Oral, R.A., "Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin üretilmesi, bazı fenolik bileşiklerin ve ekstraktların maillard reaksiyon ürünleri üzerine etkilerinin incelenmesi", Doktora Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Kayseri, (2011).
- [30] Kaya, Ü., "İzmit'te Yetiştirilen gemlik zeytininin ve yağının bazı fiziksel, kimyasal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2009).
- [31] Aktar, S., "Ulva Lactuca bitkisi'nin morfolojisi ve fenolik bileşiklerinin stabilitesi üzerine araştırmalar", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı, İzmir, (2012).
- [32] Saygın, B. "Zeytin Yaprağındaki Başlıca Fenolik Bileşikler ve Bunların Antioksidan Kapasiteleri Üzerine Araştırmalar", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, (2009).
- [33] Hürkul, M.M. ve Güvenç, A. "Çeşitli İllerimizde Aktarlarda Satılan Zeytin Yaprağı (Olive Leaf) Üzerinde Morfolojik ve Anatmik Çalışmalar", *Mersin Univ. Sağlık Bilim Derg.* 3(3), (2010).

- [34] Ağgöl, A.G., "Diyabetli Ratlarda Zeytin Yaprağı Ekstresinin Etkilerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık-Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2012).
- [35] Harp, F., "Gemlik, Domat, Adana Topağı ve Adana Yerli Zeytin Yapraklarının Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana, (2011).
- [36] Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. and Del Rio, J.A., "Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves". *Food Chemistry*, 68, 457-462, (2000).
- [37] Armutcu, F., Akyol, S., Hasgul, R. ve Yiğitoğlu, M.R., "Zeytin Yaprağının Biyolojik Etkileri ve Tıpta Kullanımı", *Spatula DD.*, 1(3), 159-165, (2011).
- [38] Erbay, Z., "Zeytin Yaprağının Sıcak Hava İle Kurutulmasının Modellenmesi, Optimizasyonu ve Ekserji Analizi", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir, (2008).
- [39] Delgado-Pertinez M., Gomez-Cabrera A. and Garrido A., "Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea* L.): digestibility and chemical composition and in vitro studies". *Anim Feed Sci Technol.*, 87(3-4), 187-201, (2000).
- [40] Martin-Garcia AI, Molina-Alcaide E. "Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* L var. *europaea*) leaves for ruminants". *Anim Feed Sci Technol.*, 142(3-4), 317-29, (2008).

- [41] Önderoğlu, S., Sözer, S. Erbil, K.M., Ortaç, R. and Lemioğlu, F. "The evaluation of long-term effect of cinnamon bark and olive leaf on toxicity induced by streptozotocin administration to rats" *J. Pharm Pharmacol*, 51, 1305-12,(1999).
- [42] Somova, L., Shode, F.O., Ramnandan P. and Nadar, A., "Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europea*, subspecies *africana* Leaves", *J.Ethnopharmacol*, 84, 299-305, (2003).
- [43] Singh, I., Mok, M., Christensen, A.M., Turner, A.H. and Hawley, J.A., "The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function", *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 18, 127-132, (2008).
- [44] Zaslaver, M., Offer, S., Kerem, Z., Stark, A.H., Weller, J.I., Eliraz, A. and Madar, Z., " Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9934- 9939, (2005).
- [45] Yıldız G. ve Uylaşer V., "Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein", *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi (Journal of Agricultural Faculty of Uludag University)*, 25(1), 131-142, (2011).
- [46] Malik, N.S.A. and J.M. Bradford. "Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives". *Scientia Hort.* 110,274-278, (2006).

- [47] Japon-Lujan, R., J. Luque-Rodríguez and M. Luque de Castro. "Dynamic ultrasoundassisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves", *J. Chromatogr. A.*, 1108, 76–82, (2006).
- [48] Boskou D., "Olive oil Chemistry and Technology", *AOCS Press*, 253, (2006).
- [49] Winkelhausen, E., Pospiech, R. and Laufenberg, G., "Antifungal Activity Of Phenolic Compoundsextracted From Dried Olive Pomace", *Bulletin of theChemistsandTechnologists of Macedonia*, 24, 41–46, (2005).
- [50] Ersus, S. ve Esen, Y.C., "Zeytin Yaprağındaki oleuropein ve Diğer Fenolik Maddeler ile Bunların sağlık açısından Yararları", *Akademik Gıda*, 6(2), 34-38, (2008).
- [51] Doğan Eroğlu, E., "Bazı Flavonoidlerin Drosophila Melanogaster'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması", Doktora Tezi, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Malatya, (2008).
- [52] Hu, C. and Kitts, D.D., "Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppressinos and COX-2 in RAW264.7 cells", *Molecular and Biochemistry*, 265(1-2), 107-113, (2004).
- [53] Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., "Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?", *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6 (2), 93 -104, (2008).

- [54] El,S.N. and Karakaya, S., "Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health" *Nutrition Reviews*, 67(11), 632-638,(2009).
- [55] <http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosol>(Erişim tarihi: 21.10.2013).
- [56] Gençer, N., "Farklı zeytin çeşitlerindeki antioksidan madde miktarının belirlenmesi ve polifenol oksidaz enzimi ile ilişkisinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004).
- [57] Işık,S.,"Biyoteknolojik yönden önemli tıbbi bitkiler ve bitkisel ürünlerde kalitenin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi,*Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, (2010).
- [58] [http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid)( Erişim tarihi: 21.10.2013).
- [59] <http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-1266CAFFEIC%20ACID.aspx?activeIngredientId=1266&activeIngredientName=CAFFEIC%20ACID>(erişim tarihi :09.10.2013).
- [60] Torun, ř. ve Toy, H., "Ratlarda Mekanik Ventilasyona Bağlı Akciğer Hasarının Önlenmesinde Kafeik Asidin Etkisi", *Solunum*, 14(2), 99–104, (2012).
- [61] Wua,J., Omene, C., Karkoszka, J., Boslanda, M., Jonathan Eckard, J., Klein, C.B. and Frenkela, K., "Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a

honey bee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer”, *Cancer Letters* 308, 43–53, (2011).

- [62] Gitzinger, M., Kemmer, C., Fluri, D.A., El-Baba, M.D., Weber, W. and Fussenegger, M., “The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice”. *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, No. 5, (2012).
- [63] Erdem, M.G., Cinkilic, N., Vatan, Ö., Yilmaz, D., Bagdas, D., Bilaloglu, R., “Genotoxic and Anti-Genotoxic Effects of Vanillic Acid Against Mitomycin C-Induced Genomic Damage in Human Lymphocytes In Vitro”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 13, 4993-4998, (2012).
- [64] Su-Jin Kim, Min-Cheol Kim, Jae-Young Um and Seung-Heon Hong, “The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis”. *Molecules*, 15, 7208-7217, (2010).
- [65] [http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol\\_summary/show\\_data.php](http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php)  
moName=vanillic\_acid&id=bmse010205 erişim tarihi: 20/10/2013.
- [66] Ziaee, A., Nassiri-Asl, M., Abbasi, E., “Effects of Rutin on Lipid Profile in Hypercholesterolaemic Rats Farzaneh Zamansoltani”, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Volume 104, Issue 3, 253–258, (2009).
- [67] Bishnoi, M., Chopra, K. and Kulkarni, S.K., “Protective effect of rutin, a polyphenolic flavonoid against haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes”, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, Volume 21, Issue 5, 521–529, (2007).

- [68] Krishna, K.M., Annapurna, A., Gopal, G.S., Chalam, C. R.V., Madan, K., Kumar, V.K., Gomedhikam J Prakash, G.J., "Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats", *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 83(4), 343-355, (2005).
- [69] Vachirapatama, N., and Chamnankid, B., "Separation and Determination of Rutin in Apples by High Performance Liquid Chromatography". *Thammasat International Journal of Science and Technology*, Vol. 17, No. 3, (2012).
- [70] Stewart, L.K., Soileau, J.L., Ribnicky, D., Wang, Z.Q., Raskin, I., Alexander Poulev, A., Majewski, M., Cefalu, W.T. and Thomas W. Gettys, T.W., "Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet", *Metabolism*, 57(7 Suppl 1), 39-46, (2008).
- [71] <http://www.mylifeforcebalance.com/articles/quercetin> erişim tarihi:(13.10.2013).
- [72] Yalçın, G. T., "Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi". *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya, (2013).
- [73] Pehlivan, M., Muharrem Güteryüz, M., "Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan sağlığı açısından önemi", *Bahçe*, 33(1-2), 51-57, (2004).

- [74] Bouaziz, M. and Sayadi, S. "Isolation and evaluation of antioxidant from leaves of a Tunisian cultivar olive tree", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107, 497-504, (2005).
- [75] Boudhrioua, N., Bahloul, N., Slimen, I. B. and Kechaou, N., "Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves". *Industrial Crops and Products*, 29, 412-419, (2009).
- [76] Erbay, Z. and Icier, F. "Optimization of hot air drying of olive leaf using response surface methodology". *Journal of Food Engineering*, 91, 533-541 (2009).
- [77] Garcia, A.I.M. and Alcaide, E.M., "Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *Europaea*) leaves for ruminants". *Animal Feed Science and Technology*, 142, 317-329 (2008).
- [78] Dogan, S., Diken, M.E. and Dogan, M. "Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants". *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2566-2573, (2010).
- [79] Karakulak, Ş. "Zeytin yapraklarından Antioksidan Eldesinde Mikrodalga ve Etüv ile Kurutmanın Çözücü, Sıcaklık ve Zaman Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi". Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul (2009).
- [80] Cemeroğlu, B., "Gıda Analizleri", Ankara: *Gıda Teknolojisi Derneği*, (2010).

- [81] Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A., “Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (4), 401-409, (2010).
- [82] J.E. Hayes, P. Allen, N. Brunton, M.N. O’Grady, J.P. Kerry, "Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid", *Food Chemistry*, 126, 948–955, (2011).
- [83] Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., et al. "Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves", *Molecules*, 12, 1153–1162, (2007).
- [84] Bilgin, M. ve Şahin, S., “Effects of geographical origin and extracti on methods on total phenolic yield of olive tree ( *Oleaeuropaea*) leaves” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 8-12,(2013).
- [85] F. Le Floch, M.T. Tena, A. R’ios, M. Valca’rcel, “Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves”. *Talanta*, 46,1123–1130, (1998).
- [86] Ok-Hwan Lee and Boo-Yong Lee, “Antioxidant and antimicrobial activiites of individual and combined phenolics in olea europaea leaf extract”, *Bioresource Technology*, 101, 3751-3754, (2010).

- [87] Ranalli, A.,Contento, S., Lucera, L., Febo, M., Archegiani, D. and Fonzo,V.,  
“Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea  
europaea* L.)”*J.Agric. Food Chem.*,54,434-440, (2006).
- [88] Goulas, V., Papoti, V.T., Exarchou, V., Maria Z. Tsimidou, M.Z. and  
Gerothanassis, I.P. “Contribution of Flavonoidsto the Overall Radical  
Scavenging Activity of Olive (*Oleaeuropaea* L.) Leaf Polar Extracts”*J.  
Agric. Food Chem.*,58, 3303–3308, (2010).
- [89] Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty, K.  
andKim, Y.C., “Assesment of phenolics-enriched extract and fractions of  
olive leaves and their antioxidant activities”*Bioresource Technology*, 100,  
6107-6113, (2009).