

1.GİRİŞ

Serbest radikaller, yapılarında eşlenmemiş elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Bunların elektron ve proton sayısı eşit olmadığından dayanıksız moleküllerdir. Radikaller tek elektronunu bir başka moleküle verebilir ve bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler. Bu şekilde radikal olmayan bir yapının, radikal şekle dönüşmesine neden olan moleküllere serbest radikaller denir [1].

Serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir. Serbest radikaller organik veya inorganik moleküller şeklinde pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Cu^{2+} , Fe^{3+} ve Mn^{2+} gibi geçiş metalleri, ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Ancak bu iyonlar, reaksiyonları katalize ettikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [2].

Reaktif Oksijen Türleri (ROT), çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R\cdot$), peroksit radikalleri ($ROO\cdot$), alkoksi radikalleri ($RO\cdot$), tiyil radikalleri ($RS\cdot$), sülfenil radikalleri ($RSO\cdot$) ve tiyil peroksit radikalleri ($RSO_2\cdot$) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna sebep olurlar [2-3].

Reaktif oksijen türlerinin ana kaynağının süperoksit radikali olduğu, onun da kaynağının mitokondri olduğu düşünülmektedir [4]. Çünkü mitokondride oksijene her seferinde sadece bir elektron transfer edilebilmesinden dolayı, elektron transferi sırasında süperoksit radikali oluşumu kaçınılmazdır. O_2^- (süperoksit), dismutasyon reaksiyonu ile bir başka reaktif oksijen türü olan H_2O_2 'i oluşturur. H_2O_2 ise toksik özelliğinden çok, reaktivitesi yüksek olan $OH\cdot$ radikali oluşturma potansiyeline sahiptir. Mitokondride yaşla beraber sabit bir şekilde O_2^- ve H_2O_2 üretim hızı da artar [5].

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır [6].

Organizmada serbest radikal oluşturan olayların başlıcaları, mitokondriyal elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyararla fagositik hücreslerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım reaksiyonlarıdır [7]. Eksojen kaynaklar ise antineoplastik ajanlar, alışkanlık yapan maddeler, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, ilaçlar, radyasyon ve strestir [2]. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemleri veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar.

1.1. Antioksidanlar

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, bunların meydana getirdiği hasarı ve oksidatif stresi önlemek için birçoğ savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları yok etme veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme. Örnek olarak antioksidan enzimler verilebilir.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 3) Serbest oksijen radikallerinin oluşumundaki mekanizmaları engelleyen zincir kırıcı etki.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın ortadan kaldırılmasındaki onarıcı etkidir [2-3].

Oksidatif fosforilasyonun solunum döngüsünün sonucu olarak salınan serbest oksijen radikalleri hücre DNA'sı gibi makromoleküllere saldırarak, sonuçta hücre yaşlanması, kardiyovasküler hastalıklar, mutajenik değişiklikler ve kanserli tümörlerin büyümesi gibi zararlı etkilere yol açabilirler.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller ile reaksiyona girmeleri dolayısıyla bu tür istenmeyen değişiklikler ve sağlık riskleri ile savaşmanın etkili yoludur. Antioksidanlar genellikle indirgeme araçları, serbest radikal yutucular veya Fenton reaksiyonlarına yol açan geçiş metal katyonlarını bağlayan kelatlayıcı maddelerdir [8].

Antioksidanlar radikal oluşumunun sınırlandırılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin

ortadan kaldırılmasından görevli moleküllerdir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik, antioksidanların yetersizliğinden veya reaktif oksijen türlerin artan oluşumundan çıkan oksidatif stresle sonuçlanır [9].

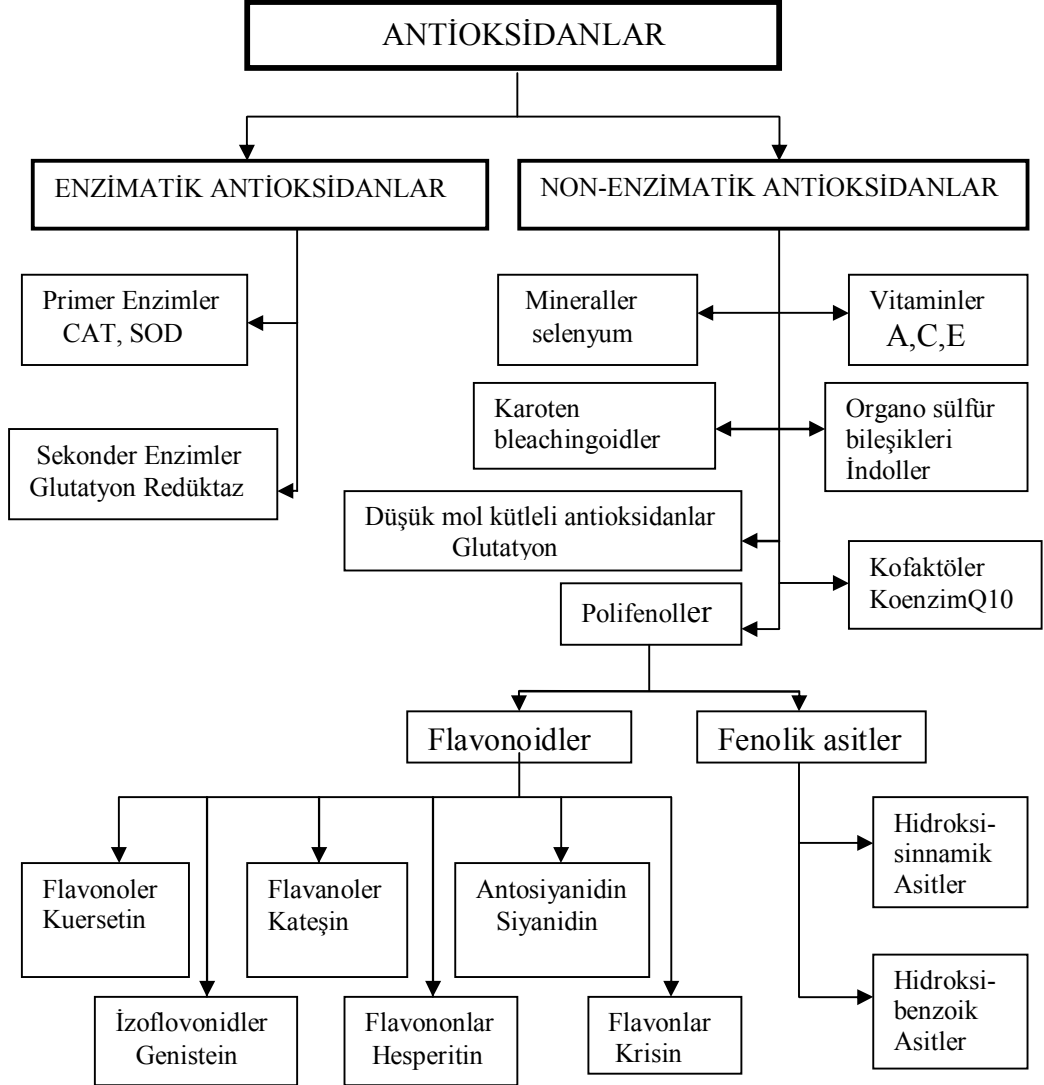
Prooksidanlar lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır [10].

Gerek doğal ve gerekse sentetik yüzlerce bileşiğin antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde endüstriyel proseslerde gıda maddelerinin depolanma stabiliteğini artırmak için çoğunlukla BHA, BHT gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların muhtemel toksisiteleri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü, doğal antioksidanlar, insanların yüzlerce yıldır tükettikleri veya gıdalara karıştırdıkları katkılardır. Bu nedenle tüketiciler tarafından güvenilir olarak görülmektedirler[11].

Bitkilerde farklı antioksidan bileşiklerin meydana geldiği bilinmektedir. Doğal antioksidanlar bitkilerin yaprak, gövde ve tohumları başta olmak üzere bütün dokularında meydana gelebilmektedir. Bununla beraber sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda antioksidan madde bulunmaktadır. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Yapılan araştırmalarda bol miktarda sebze ve meyve tüketimi sonucu, hastalıklara yakalanma riskinin azaldığı, kalp-damar hastalıklarında, kanser vakalarında ve ölüm oranlarında kayda değer azalmalar olduğu bildirilmiştir [12].

1.1.1. Antioksidanların Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Antioksidanlar yapılarına göre aşağıdaki (Şekil 1.1.) gibi sınıflandırılmıştır.



Şekil 1.1. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırılması

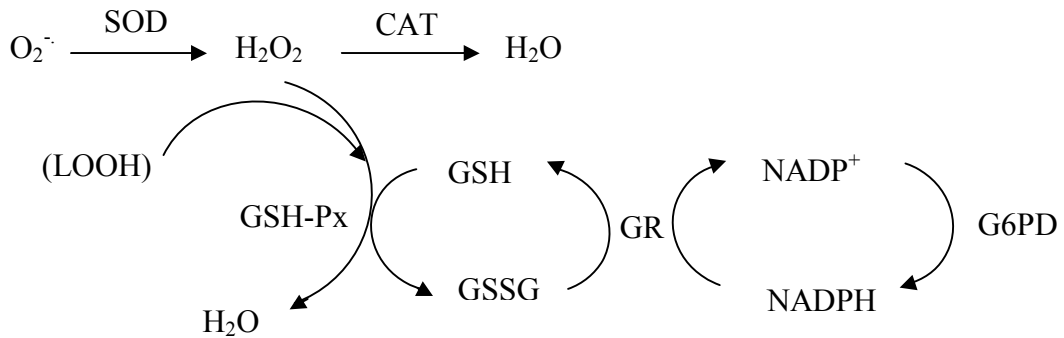
1.1.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidan maddeler; başlıca süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx) enzimlerini içerir. SOD ve CAT gibi antioksidan enzimler vücutta tükenmezler ve ROT ile reaksiyona girecek yüksek ilgiye sahiplerdir. Bu yüzden de enzimlerin oksidatif hasarlara karşı daha etkili bir koruma sağladıkları düşünülmektedir [13]. SOD ve CAT doğada da bilinen en etkili antioksidan

maddelerdendir. İnsan vücudunda üç tür SOD vardır. Bunlar; CuZn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD, ve ekstrasellüler SOD. SOD doğada yaygın olarak ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda da bulunur, oksijen ve hidrojen peroksitten süperoksit dismutasyonu ile katalizlenir [14].

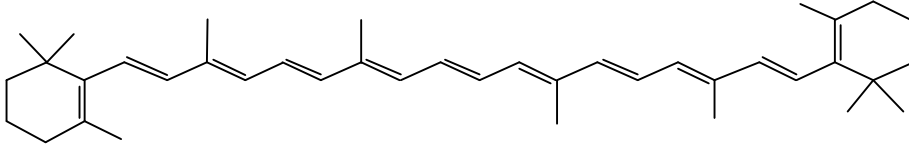
CAT peroksisomlarda bulunan bir enzimdir. Hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırmaktadır. CAT yapısında protoporfirin-IX, Fe (Hem) grubu içerir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır [15].

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Oluşan H_2O_2 , GSH-Px veya katalaz aracılığı ile suya indirgenir. Glutasyon peroksidaz fagositik hücrelerde önemli özelliklere sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engellemede etkilidir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Bu enzim fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir [16]. Enzimatik sistemler içinde SOD, CAT ve GSH-Px birincil enzimatik enzimler olarak adlandırılır. Bu birincil enzimlerden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan glutasyon redüktaz (GR) ve G6PD enzimleri de vardır ve bunlara ikincil antioksidan enzimler denir. Bu enzimler ve yer aldıkları reaksiyonlar Şekil 1.2' de gösterilmiştir [17].



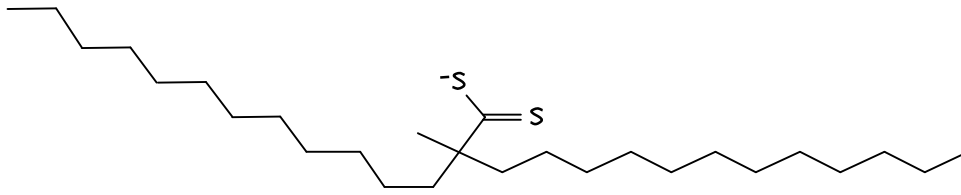
Şekil.1.2. Enzimatik antioksidanların reaksiyonları. Burada LOOH: Lipit hidroperoksiti, GSSH: Oksitlenmiş glutasyonu, GSH: İndirgenmiş glutasyonu temsil etmektedir

Karotenoidler; bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. Yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge oluşundan kuvvetli renklidirler. Açık sarıdan kırmızıya kadar renkli, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunur. En yaygın kullanılanı A-provitamini olarak da bilinen β -karoten'dir. A-vitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken, β -karoten antioksidan aktiviteye sahiptir [18].



Şekil 1.5. β -karotenin yapısı

Kuvvetli antioksidanlardan bir grubu da kükürtlü organik bileşikler oluşturur. β , β' -ditiyo propiyonik asid ve esterleri, özellikle diauril ve distearil ditiyopropiyonatlar çok etkili antioksidanlardır [19].



Şekil 1.6. Diauril ditiyopropiyonat

1.1.1.2.1. Polifenoller

Polifenoller genelde sebze ve meyvelerde bulunurlar ve metabolizmada yan ürün olarak ortaya çıkarlar. Bu bileşikler antioksidan, antikarsinogenik aktivite ve gıda kalitesine olan etkilerinden dolayı önemlidirler. Polifenoller potansiyel antioksidan bileşiklerdir ve insan sağlığına muhtemel faydaları vardır. Antioksidan polifenollerin en önemli işlevleri serbest radikalleri süpürerek, metalleri tutuklayarak ve lipid

peroksidasyonunu önleyerek oksidatif stres parametrelerini ortadan kaldırmasıdır [20-21].

Polifenoller çok sayıda hidroksil grubu içerir, bu ise bileşiğe potansiyel metal kelatlama özelliği kazandırır ve böylece zararlı bileşenleri yakalayabilir, eksik elektronlarını doyurabilir veya reaksiyon zincirini kırabilir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, polifenoller E ve C vitamininin göstermiş olduğu antioksidan özelliğın dört katına sahiptir [22-23]. Bu nedenle polifenollerin antioksidan özellikleri ve bu özelliklerin artırılmasına yönelik çalışmalar önemlidir.

Polifenolik bileşikler bitkilerde aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenen yan bileşiklerden oluşan ikincil metabolitler olup doğada yaygın olarak bulunurlar [24]. Bunlar meyveler, sebzeler, içecekler ve tahıllarda antioksidan aktivite, duysal ve beslenme kalitesine katkıda bulunurlar. Genellikle meyvelerde polifenolik bileşikler sebzelerden daha fazla bulunur [25]. Yapılan araştırmalar da kırmızı eriklerin, çileklerin antosiyanince zengin; portakal ve üzüm sü meyvelerin flavanon bileşiklerince zengin; yeşil elma, soğan, marul brokoli, ıspanak, kabak gibi sebze ve meyvelerince flavonol bileşiklerince daha zengin; ve bezelye, domates ve şeftalilerin hidroksisinamik asitlerce daha zengin olduğu belirlenmiştir [26].

Polifenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma ve singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbonhidrat, nükleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını engellemek için aromatik halkarındaki hidroksil gruplarında bulunan hidrojeni verebilmektedirler.

Polifenolik bileşiklerin fizyolojik açıdan ise en önemli özelliği, antioksidan etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu flavonoidlerin birçoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği ve metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir [27-24].

Epidomolojik çalışmalarda polifenollerce zengin gıdaların tüketiminin kanser, felç, koroner kalp damar ve kemik hastalıkları riskini azalttığı belirlenmiştir. Polifenoller indirgen maddelerdir ve C vitamini, E vitamini ve karotenoidler gibi diğer indirgenlerle beraber vücut dokularını oksidatif stresten kaynaklanan hastalıklardan

korurlar [28]. Polifenoller üç önemli gruba ayrılır: Fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler.

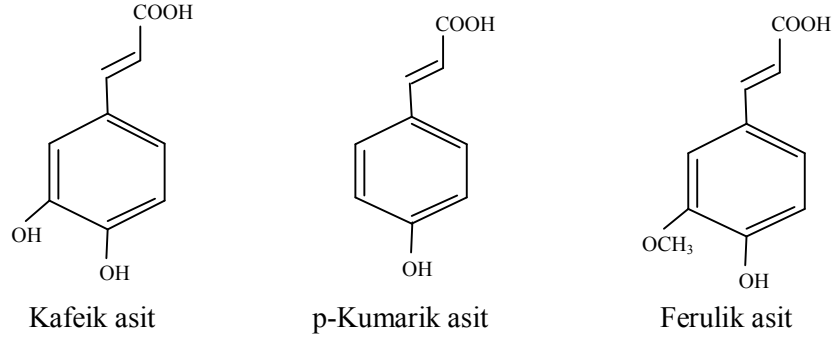
1.1.1.2.1.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler genel olarak serbest halde bulunmazlar. Karboksil grupları karbonhidratlar, glikozitler, amino asitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterler, amino bileşikleri ile de amidleri oluştururlar. Fenolik asitler; hidroksisünamik asit (C6-C3), hidroksibenzoik (C6-C1) asitler ve hidroksifenilasetik asit(C6-C2) gruplarını içerir. Fenolik asitlerin fenolik hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar [26].

Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sünamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi-sünamik asitler oluşturur [29]. L- fenil alanin veya L- tirozinden p-kumarik, ferulik, kafeik, sünapik ve klorojenik asit meydana gelir. Yapılarındaki -CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini arttırmakla birlikte benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Benzoatlardan daha etkilidirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik, protokateşuik asit'dir. Mono hidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasında metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o-p pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, m-p pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer [30].

1.1.1.2.4.1.1. Hidroksisünamik Asit

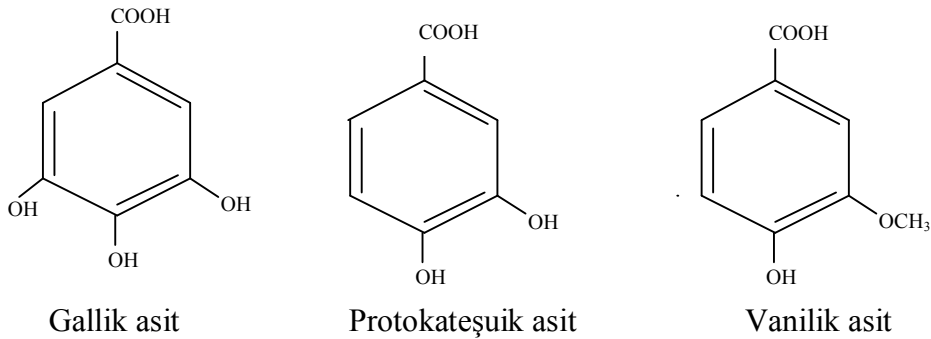
Hidroksisünamik asit (HCA) türevleri bitki dokularında yaygın olarak bulunurlar ve fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellik gösterirler. HCA arasında ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve sünapik asit önem taşımaktadır. Hidroksisünamik asitler taze sıkılmış üzüm suyunda yüksek miktarda bulunmaktadır [31].



Şekil 1.7. Bazı hidroksisinasamik asitlerin yapısal formülleri

1.1.1.2.4.1.2 Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler (HBA) C₆-C₁ fenilpropan yapısındadır. HBA bitkisel gıdaların yapısında genellikle az miktarlarda bulunur veya hiç bulunmayabilirler. Bunlar arasında salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, protokateşuik asit, sirinjik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik ve gallik asit gibi asitler sayılabilir (Şekil 1.8).

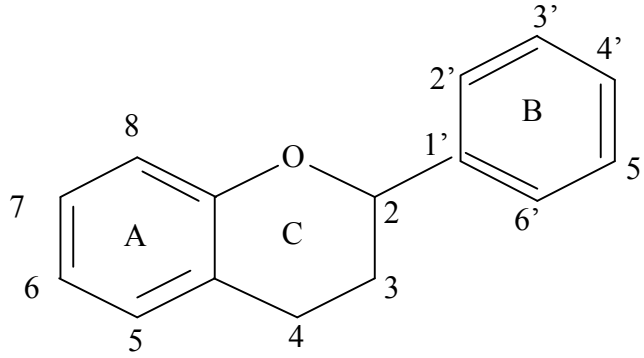


Şekil 1.8. Bazı hidroksibenzoik asitlerin yapısal formülleri

1.1.1.2.4.1.2 Flavonoidler

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü

(') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 1.9). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-orto glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal yok etme ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [18].



Şekil 1.9. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı [18]

Flavonoidler molekülde bulunan aromatik halkalara bağlanan substituentlerinin sayısı, özelliği, bağlanma pozisyonlarına göre farklı kimyasal yapılara ve fizyolojik etkilere sahiptir. Antosiyanidinler, flavon ve flavonoller, flavanonlar, kateşin ve lökoantosiyanidinler, ve isoflavonlar olmak üzere beş gruba ayrılırlar [26].

1.1.1.2.4.1.3 Tanenler

Polifenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Yoğunlaşmış tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmaktadır. Kırmızı ve beyaz şarapta, çay, elma ve nar suyunda, baklagil ve tahıllarda fazlaca bulunurlar. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir [30].

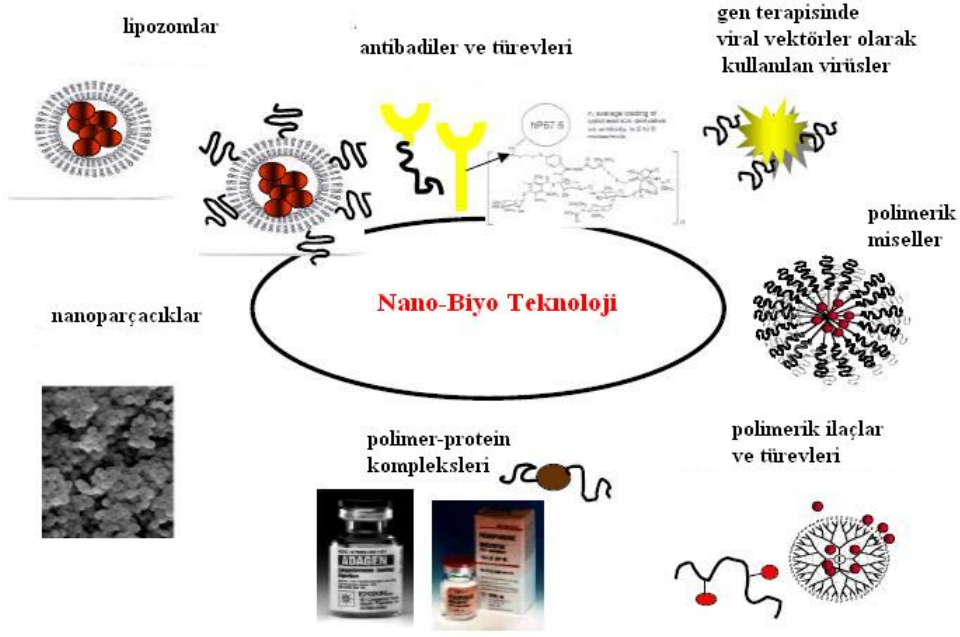
1.2. Nanoteknoloji

Kaliforniya'daki Foresight Enstitüsü başkanı Dr. Eric Drexler, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'ndeki (MIT) eğitimi sırasında, biyolojik sistemlerden esinlenerek molekül sel makineler yapılabileceğini önermiş ve nanoteknoloji kelimesini ilk kez ortaya çıkarmıştır.

Nanometre ölçü olarak metrenin milyarda birini ifade etmektedir. Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında malzeme tasarlayıp üretmeyi, bu malzemelerde yeni yöntemlerle belirlenmiş amaçlara yönelik aygıtlar ve aletler üretmeyi amaçlamaktadır. Günümüzde bu nanomakineler iki amaca yönelik yapılmakta olup ilkinde her yapının, etkinin ve faaliyetin atomik düzeyde bir duyarlılıkla kontrol edilmesi, ikincisinde ise belli bir amaca yönelik olası en küçük makinenin yapılması amaçlanmaktadır. Biyoloji dünyası için nanoteknolojinin geçmişi üç milyar yıldan fazladır. Çünkü, ilk canlı hücrenin varlığından bu yana hayatsal faaliyetleri yürütme maksatlı nanometre boyutlarındaki çeşitli fonksiyonel yapılar yani hücre sel komponentler, canlı hücreler içerisinde imal edilmektedir. Bu yapıları anlatılan tanımlara uyarlayacak olursak komponentlerin yani organellerin her birinin hücre sel faaliyetlerde canlılığın devamı için özgün görevleri vardır. Doğada benzer pek çok örnekle karşılaşmak mümkündür [32].

Günümüzde, bilimlerdeki hızlı gelişmelerin heyecan verici ve ilgi uyandıran bölümü nanoteknolojidir. Bu alan sayesinde, endüstriyel ve teknoloji alanlarında olduğu gibi biyoloji ve tıp alanlarında da hızlı gelişmeler görülmüştür [32].

Nanoteknoloji ile biyoteknolojinin birlikte gelişmesi ve moleküler biyoloji alanındaki çok hızlı bilgi birikiminin, bu iki alanı beslemesiyle; nanobiyoteknoloji araştırma alanı ortaya çıkmıştır. Bu sayede, bugüne kadar mümkün olmayan tanı ve tedavi, artık insanda kullanılmaya başlamıştır. Kanseri, enfeksiyon ve alerjiye karşı tedaviler, nanobiyoteknoloji sayesinde geliştirilmektedir. Nanoteknoloji bir çok klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Biyoteknolojide kullanılan, nano ölçekli çeşitli malzemeler

Son yıllarda araştırmacılar; hastalık tanı ve tedavisi, ilaç salınım sistemleri, yenilenebilir ilaçlar gibi konuların yanında bio-uyumlu, antibakteriyel, antioksidan özellik gösteren bileşikler üzerinde de yoğun olarak çalışmaktadırlar. Hazırlanan malzemelerin *in vivo* ve *in vitro* şartlardaki biyolojik testleri, metabolizmaya etkileri ve aktiviteleri üzerinde araştırma yapılan konular arasındadır.

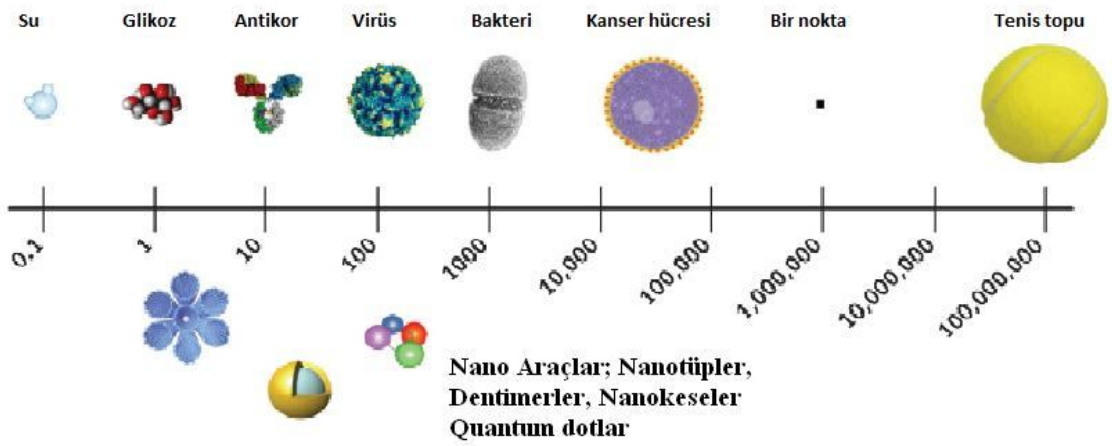
Oksidatif strese karşı geliştirilen yeni antioksidatif bileşiklerin sentezi, *in vivo* ve *in vitro* antioksidatif kapasitelerinin belirlenmesi konusu ile birlikte özellikle nanomateryal temelli veya belli nano ölçüm aralıklarındaki çeşitli materyallerin hücre sitotoksitesi ile birlikte bazı durumlarda bilinen antioksidatif bileşiklerden daha etkin koruyucu özellikler gösterdiği belirtilmektedir [33,34].

1.2.1. Nano-Malzeme

Bir nano malzemeyi diğerlerinden ayıran temel iki özellik vardır: Artan yüzey alanı ve kuantum etkisi. Bu özellikler tepkinlik, sertlik ve elektriksel özellikler gibi artırılabilir özelliklerdir. Bir malzemenin boyutunun küçültülmesi halinde iç kısmında bulunanlarla karşılaştırıldığı zaman, malzemenin yüzeyindeki atomların sayısı artacaktır. Örneğin 30, 10 ve 3 nm boyutlarındaki malzemelerin yaklaşık olarak

atomlarının % 5, % 20 ve % 50 si malzemelerin yüzeylerinde bulunur. Dolayısıyla nano malzemeler makro boyutlarıyla kıyaslandığında çok daha büyük bir yüzey alanına sahiptir. Büyümenin ve kimyasal tepkimelerin yüzeyde olduğu düşünülürse nano malzemelerin mikro boyutlardaki malzemelerden daha etkili olduğu söylenebilir [35].

Nano parçacıklar, literatürde 100 nm' den küçük boyutlara sahip ve özellikleri mikro boyutlarından farklı olan parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Parçacık boyutunun küçülmesi, parçacığın erime noktası, optik özellikleri, kinetik kararlılığı ve termodinamik özelliklerini değiştirmektedir. Bu değişimler nedeniyle nano parçacıklar elektronik cihazlardan tıbbi tanı ve tedavi sistemlerine kadar çok geniş bir aralıkta kullanılmaktadır [35].

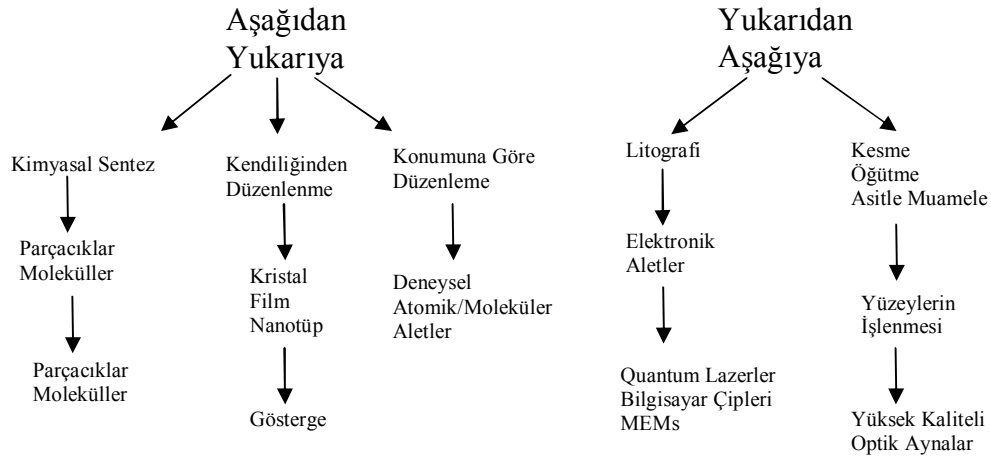


Şekil 1.11. Nano, mikro ve makro ölçünün karşılaştırılması [36].

Yüzey tepkimeleri, bir parçacığın kararlılığı ve aktifliği konusunda birinci derecede önemlidir. Parçacığın boyutunun küçülmesi yüzey alanının büyümesine neden olacağından nano parçacıklarla gerçekleştirilen kimyasal tepkimeler mikro boyutla kıyaslandığı zaman bazı farklılıklar ortaya çıkacaktır. Dolayısıyla kinetik özellikler de değişecektir. Örneğin kataliz tepkimelerinde nano parçacıkların kullanılması tepkimeyi hızlandırmaktadır.

Son zamanlarda, polimerle korunmuş metal nanopartiküller geliştirilmiş ve bu metal nanopartiküllerin hidrojenasyon, oksidasyon ve hidrasyon gibi çeşitli reaksiyonları katalizleyerek fonksiyon gösterdikleri ortaya konmuştur [6,37]. Biyolojik bilimlerde altın nanopartiküller ilk olarak TEM [38] için nanoprob olarak kullanıldılar.

Ayrıca nano-Pt'in reaktif oksijen türlerini, süperoksit anyon radikallerini (O_2^-) ve hidrojen peroksidi (H_2O_2) süpürücü yeteneğe sahip olduğu gösterilmiştir. Nano-Pt'nin SOD/Katalaz'ı taklit eder gibi hareket ettiği de belirtilmiştir [39]. Özellikle son yıllarda nanopartiküller ilaç salınım sistemlerinin sentezinde çok büyük bir ilgi görmüşlerdir. Çeşitli kalitelerde, hızlarda ve miktarlarda nano yapıların sentezlenmesi için birçok yöntem mevcuttur. Ancak temelde “yukarıdan aşağıya” ve “aşağıdan yukarıya” yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Şekilde çeşitli yöntemlerle elde edilebilecek malzemelere örnekler verilmektedir.



Şekil 1.12. Nano fabrikasyon yöntemleri.

Aşağıdan yukarıya sentez yöntemleri, atomlardan veya moleküllerden başlanarak yapının oluşturulmasına dayanır.

Bu çalışmada yukarıdan aşağıya sentez yöntemlerinden olan “nano precipitation” tekniği kullanılacaktır. Bu teknik genel olarak amfifilik diblok kopolimerler kullanılarak, yüksek yoğunlukta kararlı nano parçacıkların üretim tekniğidir. Bu yöntemle 50-500 nm boyut dağılımına sahip eş dağılımlı parçacıklar hazırlanabilir. Diblok kopolimer olarak poly(d,l-laktik-co-glikolik asit) (PLGA) asit türevli polimerler kullanılabilirdiği gibi akrilat türevli çeşitli ticari diblok kopolimerlerde kullanılabilir. Ancak polimer derişiminin yüksek olması nano parçacık oluşumunu engellemektedir.

Bu yöntem daha çok ilaç salınım sistemlerinde, en-kapsülasyon amacıyla kullanılmıştır. Çözgen, polimer türü derişimi gibi parametreler, elde edilecek parçacığın boyutları üzerinde oldukça etkilidir [35]. Ayrıca solvent/non-solvent hacim oranı da

nano-çöktürme yönteminde önemli parametrelerdendir. Örneğin çözen olarak alkol kullanılması halinde parçacık boyutu sırasıyla metanol<etanol<propanol şeklinde artmaktadır. Ortama Tween 80, Span 80 gibi çeşitli yüzey aktif maddelerin eklenmesi parçacık boyutunu önemli ölçüde değiştirmektedir. Uygun parametreler sağlandığı zaman nano çöktürme tekniği kullanım alanı çok geniş ve uygulanabilir bir tekniktir.

Birçok hastalığın temel nedenleri arasında serbest radikaller ve oksidatif stres rol oynamaktadır [40]. Bu nedenle serbest radikalleri ortadan kaldıran ajanlar olarak antioksidan bileşiklerin önemi artmaktadır. Bu çalışma antioksidan özelliği bilinen polifenol bileşiklerin nano-precipitation tekniği ile hazırlanması ve bu yapılar ile temel yapılar arasındaki antioksidan özellikteki değişimlerin *in vitro* antioksidan aktivite ölçüm yöntemleri kullanılarak test edilmesidir. Bu sayede birçok hastalığın tedavisinde kullanılan doğal antioksidanların daha verimli şekilde kullanılması sağlanacaktır. Ayrıca bu çalışma sentetik antioksidanların hazırlanması ile ilgili ileri çalışmalara önemli katkı sağlayacak bilgilerin ortaya konması açısından da önemlidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan ve bu eşleşmemiş elektronları sebebiyle genellikle kararsız ve çok reaktif moleküllerdir. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açarlar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar. Yapılan çalışmalarda antioksidan özellik gösteren maddeler nano boyuta getirilmiş ve antioksidan özelliklerinin arttığı görülmüştür[41, 42, 44].

T. Wu [41] vd kuarsetini edukatrit ve polivinil alkolle, nano precipitation tekniğini kullanarak nano boyuta getirmiş ve kuarsetin yüklenmiş nano parçacıkların antioksidan aktivitelerini karşılaştırılması hakkında yaptıkları *in vitro* antioksidan aktivite ölçümleri sonucunda, kuarsetin yüklenmiş nano partiküllerinin antioksidan aktivitesinin temel boyuttaki kuarsetinden daha fazla aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Y. Zhang [42] vd kuarsetin ve kuarsetin yüklenmiş kitosan nano parçacıkların antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlar ve kuarsetin yüklenmiş kitosan nano partiküllerinin temel boyuttaki kuarsetinin antioksidan aktivitesinden daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

J. Yang [43] vd silisyum oksitle üzeri kapsüllenecek oluşturulan nano vitamin C' nin normal vitamin C ile aynı etkiyi gösterdiği üzerine çalışmışlardır. Buna ilaveten Zhou Nie [44] vd yaptıkları çalışmada α -tokoferol (vitamin E) türevi altın trolox nano partikülleri üretilip, yaptıkları DPPH antioksidan aktivite ölçüm testinde, troloxdan 8 kat daha fazla antioksidan aktivite gösterdiğini sonucuna varmışlardır.

J.S. Lee [45] vd Çin ve Kore'de geleneksel tedavilerde ilaç olarak kullanılan antioksidan özelliklere sahip *elsholtzia splendens* ekstraktını kitosana yükleyip nano boyuta getirmişler ve nano *elsholtzia splendens* ekstraktı parçacıklarının antioksidan aktivitelerini *elsholtzia splendens* ekstraktı ile karşılaştırılması hakkında yaptıkları DPPH ve β -karoten bleaching *in vitro* antioksidan aktivite ölçümleri sonucunda nano boyutta daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varmışlardır. J. Liu [46] vd antioksidan özellik gösteren geleneksel Çin tıbbında kullanılan *Salvia miltiorrhiza* (Danshen)'in nano boyutta hazırladığı ve temel boyuttaki antioksidan aktivitesinden daha fazla aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

D. Schubert [47] vd CeO_2 ve Y_2O_3 partiküllerini nano boyuta getirmişler ve CeO_2 , Y_2O_3 'in nano boyutta sinir hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğunu ve

antioksidan aktivite gösterdiğini sonucunu elde etmişlerdir ve bu grup maddelerin biyolojik sistemde oksidatif stresi kontrol etmede kullanılabileceğini söylemişlerdir.

Glutasyon peroksidaz ve thioredoxin redüktaz önemli selenoenzimlerdir fakat selenyum pro-oksidan etkisini yüksek seviyede toksisite göstererek sağlar. H. Wang [48] vd nano selenyum enzimlerin glutasyon peroksidaz ve thioredoxin redüktazın etkisini artırdığı ve toksisitesini düşürdüğü sonucuna ulaşmışlar ve bu sonuçla, selenyumun nano boyutta antioksidan aktivitesini düşük toksisitesinde de gösterebileceğini ileri sürmüşlerdir.

H. Wang [49] vd antioksidan özellik gösteren melatonin ve selenyum nano parçacıklarını kullanarak karaciğer hasarına neden olan bacillus Calmette-Guérin ve lipopolisakkaritlere karşı koruma sağladığını fareler üzerinde yapılan çalışmalarla bulmuşlardır. E.M. Gordon [50] vd kanser tedavisi için nano boyutta Reximmune-C adlı ilacı üretmişler ve vücutta varolan diğer kanser hücreleri, vücudun kendi bağışıklık sistemi elemanları ile etkisiz hale getirdiği sonucuna varmışlar. Ayrıca bu çalışmada ilaç salınım sistemi kullanımının kanser tedavisi için önemli olduğunu belirtmişlerdir.

R.M.L. Schultz [51] vd fenolik antioksidan BHT ile tek duvarlı karbon nano tüpleri fonksiyonolize etmişlerdir. Oksijen radikal absorban kapasite ölçümlerinde BHT ile fonksiyonolize edilmiş tek duvarlı karbon nano tüplerin dentrik fullerenlere göre yaklaşık 40 kat daha fazla antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir ve BHT ile fonksiyonolize edilmiş tek duvarlı karbon nano tüplerin toksisite ölçümlerinde hücrelere hiçbir zararının olmadığını sonucunu elde etmişlerdir ve BHT ile fonksiyonolize edilmiş tek duvarlı karbon nano tüplerin antioksidan materyal ve medikal tedavilerde etkili bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Y.C. Chen, [52] vd jelatin ve çay kateşinini karıştırarak nano boyuta getirmişler ve çay kateşinini için koruyucu madde olarak kullanmışlardır. ABTS ve DPPH antioksidan aktivite ölçümleri çay kateşininin 3 hafta boyunca antioksidan aktivitesini kaybetmediği sonucuna vardılar. Bu sonuçla çay kateşin-jelatin nano partiküllerinin oksidasyondan ve enzimatik bozulmadan koruyabilecek çok iyi bir antioksidant taşıyıcı olabileceğini belirtmişlerdir.

T. Xia, [53] vd TiO₂, ZnO ve CeO₂ metal oksitlerini nano boyuta getirdiler. Temel boyutlarda sitotoksik etki gösteren bu metal oksitlerin, nano boyutta fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda sitotoksik etki göstermediği ve oksidatif strese karşı da koruyucu etkide bulunduğu sonucuna varmışlardır ve nano metal

oksidlerin biyolojik yapılarda toksisiteyi ve oksidatif stresi azaltmak veya yok etmek için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

L. Zhang, [54] vd apoferritini platinle kapsüle edip nano boyuta getirmişler ve apoferritini, platinle kapsülenmiş apoferritinin SOD aktivitesi ve artan H₂O₂ miktarına göre karşılaştırmışlar. Nano apoferritinin SOD aktivitesinin daha fazla olduğu ve H₂O₂ miktarını azalttığı ve ROT kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın deneysel kısmında kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Araç Gereçler

Deneylerde, Memmert (WBU 45) ısıtıcı, İka (RV 05 Basic 1B) Rotari Evaporatör, Heraeus (Fuktion Line) etüv, Shimadzu (AX 200) 0,0001 duyarlılıkta terazi, Hana (HI 190M) magnetik karıştırıcı, Hana (pH 211) pH metre, Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu, Shimadzu (UV-1601) Spektrofotometre, Heidolph (Reax Top) vorteks, santrifüj cihazı (Minstral 1000), Hettich (Universal 32R) santrifüj, Brand (transferpette) otomatik pipetler, teknik (B8) distile su üretme cihazı, 3 ml-disposable küvet (Pharmacia LKB Novaspec II), Zetasizer nano-2s (Malvern) kullanıldı.

3.1.2. Kimyasallar

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler; DPPH (2,2-Diphenyl-1-pirlyhidrazyl) (Sigma), TCA (trikloroasetik asit) (Sigma), Kateşol (Sigma), p-Kumarik Asit (Sigma), Dopamin (Sigma), 4-Metil Kateşol (Sigma), Linoleik asit (Sigma), Kafeik asit (Sigma), Tween 20 (Riedel), Trans-beta-karoten (Sigma), FeSO₄ (Sigma), Potasyum ferri siyanür (Sigma), Polivinil alkol (Sigma), Demir (III) klorür (Riedel), Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel), Hidrojen peroksit (Riedel), Amonyum tiyosiyanat (Riedel), ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6sulphonic acid) (Fluka), K₃Fe(CN)₆ (Fluka), Metanol (Fluka), Kloroform (Fluka), Sodyum salisilat (Merck) temin edilmiştir.

3.2. Analiz Metotları

3.2.1. Polifenollerin Nano Boyuta Hazırlanması

Polifenollerin nano boyutta hazırlanması T. Wu [41] vd göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Antioksidan madde, poli vinil alkol oranları 1:10 olacak şekilde ayarlanarak nano-çöktürme (nano-precipitation) yöntemiyle nanoparçacıklar hazırlandı. 100 mg antioksidan madde ve uygun miktardaki 50 ml mutlak etanol içerisinde çözüldü. Başka bir deney kabında 150 ml su içerisinde uygun miktarda PVA 24 saat karıştırılarak çözüldü. PVA kullanılmadan önce filtre edildi. Her iki çözelti de hazırlandıktan sonra, organik faz (etanol çözeltisi) PVA çözeltisi içerisine enjekte edilerek 22.000 rpm karıştırma hızında 25 dk karıştırıldı. Zeta-sizer cihazıyla malzemelerimizin boyutları ölçüldü. Elde edilen nanoparçacıkların kurutulması amacıyla dondurarak kurutma yöntemi kullanıldı. Antioksidan testler yapılacağı zaman elde edilen nanoparçacıklar tekrar etanolde dağıtılarak kullanıldı.

Deneylerin sürekliliğini sağlamak amacıyla, hazırlanan nano parçacıkların tamamı kurutulmamış ve direk çözelti ortamından alınarak testler yapılmıştır.

3.2.2. Antioksidan Aktivite Ölçüm Testleri

3.2.2.1. Radikal Süpürme Gücü (RSG) Ölçümü

Difenil Pikril Hidrazil (DPPH) sentetik radikali kullanılarak maddelerin RSG değerinin ölçümü, Yen ve ark.,[55]'a göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

DPPH sentetik radikali *in vitro* antioksidan aktivite ölçümlerinde sıklıkla kullanılan sentetik bir radikaldir. Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenilpikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında alkolde çözünen DPPH radikallerinin reduksiyonuna dayanmaktadır. Bu bileşiğin metanol çözeltisinin 517 nm'de sahip olduğu menekşe-mor renk, ortamdaki H⁺ donörlerinin konsantrasyonu ve gücü oranında kaybolmaktadır. Bu renk kaybı spektrofotometrik olarak ölçülüp antioksidan aktivite belirlenmektedir.

DPPH çözeltisi, her deney için günlük hazırlanmış olup, 0.025 g./L'lik DPPH çözeltisi için 2.5 mg DPPH radikali 100 ml metanol içinde çözülmüş ve kullanılincaya

kadar ağız kapalı bir kapta derin dondurucuda saklanmıştır. Spektrofotometre küvetlerine 50 µl, 100 µl nano ve normal boyuttaki maddeler eklenip metanolla 100 µl'ye tamamlanmıştır. Kör numune için küvete 100 µl saf metanol konmuştur. Böylece örneklerin farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. Her bir küvete 2.3 ml DPPH çözeltisi pipetlenmiş ve küvetler birkaç kez ters-düz edildikten sonra karanlık bir yerde, oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır. 30 dakika sonra küvetlerin 517 nm' deki absorbansı saf metanole karşı okunmuş, RSG değerleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$RSG = 1 - [A_{\text{Ö:30}} \div A_{\text{K:30}}] * 100$$

$A_{\text{Ö:30}}$: Örneğin 30.dakikadaki absorbansı

$A_{\text{K:30}}$: Kontrolün 30. dakikadaki absorbansı

3.2.2.2. β -Karoten Bleaching Metoduyla Antioksidan Aktivite Ölçümü

Antioksidan aktivite ölçümü, Moure [56] vd göre ve deney şartlarının gerektirdiği bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. 2 mg kristal trans-beta-karoten, 10 ml kloroform içinde çözülerek stok beta-karoten çözeltisi hazırlanmıştır. 250 ml'lik yuvarlak tabanlı bir balona; 40 µl linoleik asit ve emülgatör olarak 500 µl tween-20 konularak üzerine beta-karoten çözeltisinden 1 ml konulmuş ve hızla karıştırılarak balon içeriğinin homojen bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Kloroform rotary evaporatörde 40⁰ C'de vakum altında 5 dakikada uzaklaştırılmıştır. Balona 100 ml destile su, yavaşça konularak ve kuvvetlice çalkalanarak tam bir emülsiyon oluşması sağlanmıştır. Bu emülsiyon ışıktan ve havadan etkilenmeyeceği soğuk bir yerde kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Deney tüplerine 50µl, 100µl nano ve temel boyuttaki maddeler eklenip metanolla 100 µl'ye tamamlanmıştır. Kontrol için 100 µl metanol kullanılmıştır. Her bir tüpe 2.5 ml β -karoten emülsiyonu konulup, tüpler 50⁰ C'de su banyosuna konulmuş, 90 dakika sonunda emülsiyonların 470 nm'de absorbans ölçülerek antioksidan aktivite aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$AA = [(A_{\text{Ö:90}} - A_{\text{K:90}}) / (A_{\text{K:0}} - A_{\text{K:90}})] * 100$$

$A_{\text{Ö:90}}$: Örneğin 90. Dakikadaki absorbansı

$A_{\text{K:90}}$: Kontrolün 90. Dakikadaki absorbansı

$A_{\text{K:0}}$: Kontrolün 0. Dakikadaki absorbansı

3.2.2.3. İndirgeme Gücü Ölçümü

İndirgeme gücü ölçümünde Hwang [57] vd'nin kullandığı yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Cam tüplere 50, 100 µl maddelerimiz konularak saf suyla ile 1 ml'ye tamamlanmış, kontrolde örnek yerine saf su kullanılmıştır. Her tüpe 2.5 ml 0.2 M fosfat tamponu (pH: 6.6) ve 2.5 ml % 1'lik potasyum ferri siyanür ilave edilerek karışım su banyosunda 50⁰ C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Su banyosundan alınan tüplerin üzerine 2.5 ml % 10' luk trikloro asetik asit eklenip tüpler çalkalanmış daha sonra santrifüj cihazının tüplerine alınan örnekler, 3000 dev/dak'da 10 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj sonucu ayrılan serumdan 1.25 ml alınarak üzerine 1.25 ml destile su ve 0.25 ml % 0.1' lik FeCl₃.6H₂O çözeltisi ilave edilmiş renklenmiş çözeltinin 700 nm' deki absorbansı köre karşı okunmuştur. İndirgeme gücü, absorbansa göre karşılaştırılmıştır.

3.2.2.4. ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

ABTS radikali giderme aktivitesi Re [58] vd yaptığı çalışmaya göre belirlendi. Nispi antioksidan kapasitesini ABTS radikalini kullanarak ölçen bu metot hidrojen verici ve serbest radikal zincirlerini kırıcı antioksidan maddelerin aktivitelerini belirlemede etkilidir. Örneklere uygulanan ABTS yöntemi sonuçları % radikal süpürme şeklinde değerlendirildi. ABTS radikali; potasyum peroksodisülfat (6.6 mg) ve ABTS (30 mg)'nin 7.8 mL sulu çözeltisinin oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilmesiyle elde edildi. Elde edilen renkli etanolde absorbansı 734 nm'de 0.700±0.020 olacak şekilde seyreltilerek gerekli ABTS solüsyonu elde edildi.

3 ml'lik küvetlere 50 µl, 100 µl nano ve normal boyuttaki maddeler eklenip saf suyla 100µl'ye tamamlanmıştır. Kör numune için küvete 100 µl saf su konmuştur. Böylece örneklerin farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki çözeltilere 2.3 ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildikten sonra köre karşı 737 nm'de absorbansları ölçülerek antioksidan aktivite aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$AA = 1 - [A_{\text{Ö:30}} \div A_{\text{K:30}}] * 100$$

A_{Ö:30}: Örneğin 30.dakikadaki absorbansı

A_{K:30}: Kontrolün 30. dakikadaki absorbansı

3.2.2.5. OH⁻ İndirgeme Gücü Ölçümü

Hidroksil radikalleri hücre membranları ve diğer biomoleküller için çok zararlı bir serbest radikaldir. Hidroksil radikallerini süpürme, hücreleri oksidatif hasardan korumada önemlidir. OH⁻ indirgeme gücü ölçümü Smirnoff and Cumbes'a [59] göre yapıldı. Hidroksil radikalleri FeSO₄ ve H₂O₂ içeren sisteme göre üretildi ve hidrokşi salisilatla etkışimine bakıldı [60]. Örneklere 1 ml FeSO₄ (1.5 mM), 0.7 ml H₂O₂ (6 mM), 0.3 ml sodyum salisilat (20 mM) eklendi. 60 dakika 37⁰ C'de inkübasyona bırakıldı. 562 nm'de absorbanları kaydedildi. Antioksidan aktivite aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$AA=[1-(A_1-A_2)/A_0]*100\%$$

A₀ :Kontrolün absorbanı

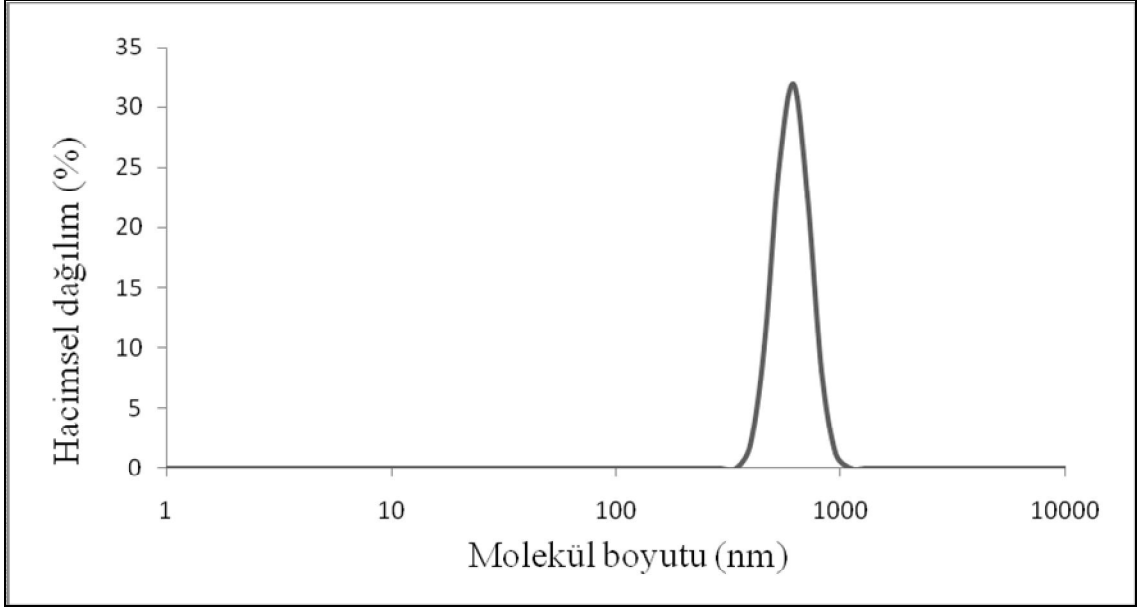
A₁ :Örneğin absorbanı

A₂ :Örneğin sodyum salisilatsız absorbanı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

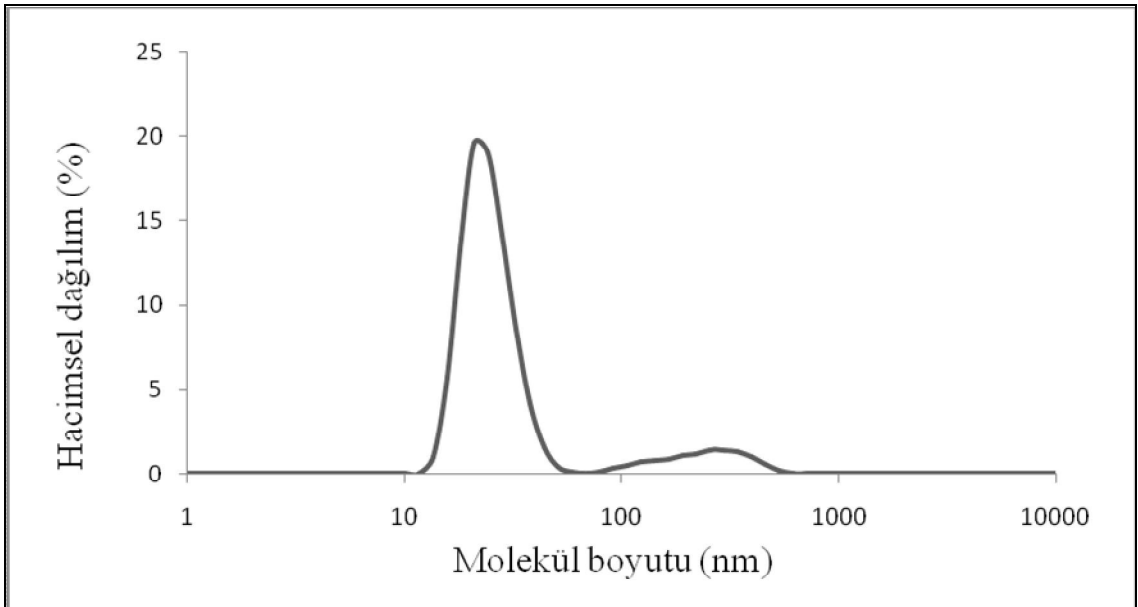
4.1. Hazırlanan Polifenollerin Nano Boyut Ölçümleri

4.1.1. Kateşölün Boyut Ölçümleri



Şekil 4.1. Kateşölün molekül boyutu

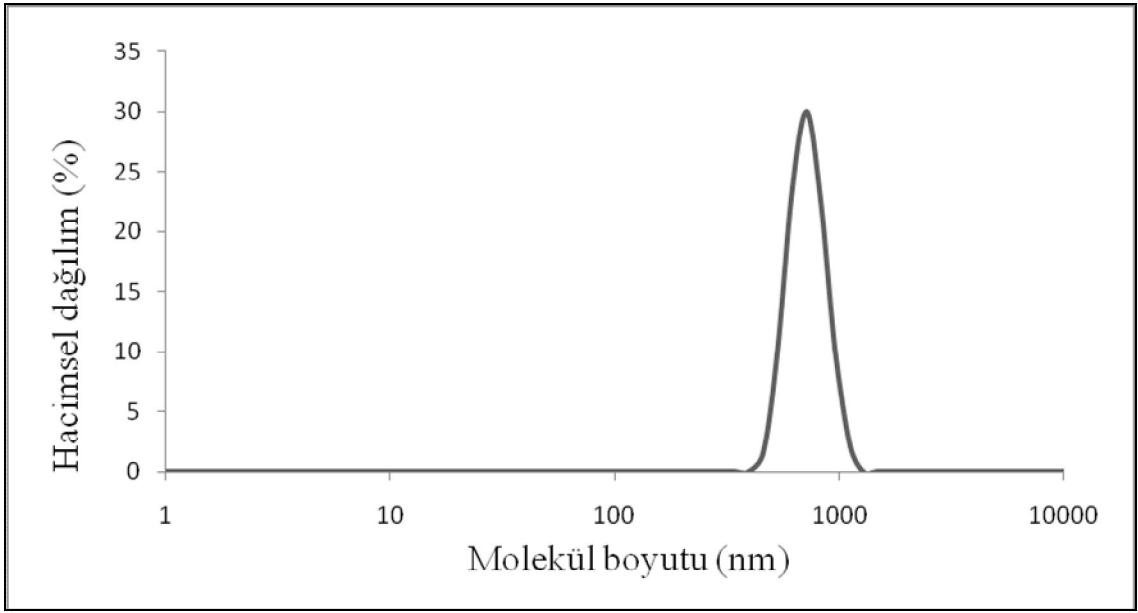
Kateşölün molekül boyutu % 100'ü 657 nm olarak ölçüldü.



Şekil 4.2. Nano Kateşölün molekül boyutu

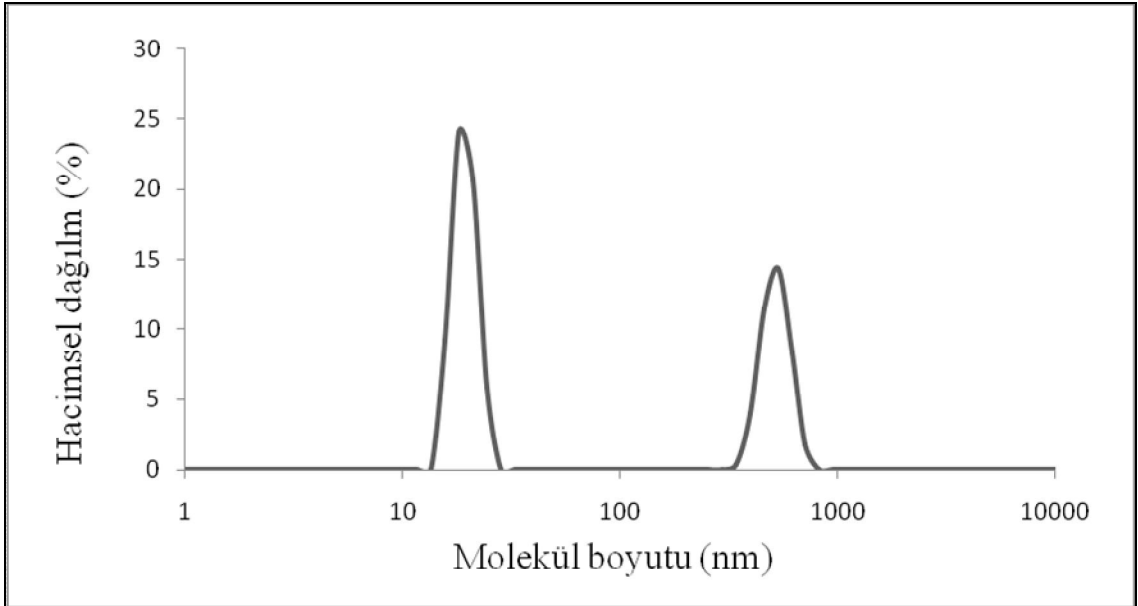
Nano kateşölün molekül boyutu % 90.8'i 23.6 nm, % 9.2'si 185 nm olarak ölçüldü. Kateşölün nano boyuta getirildiği görüldü.

4.1.2.Kafeik Asitin Boyut Ölçümleri



Şekil 4.3:Kafeik asitin molekül boyutu

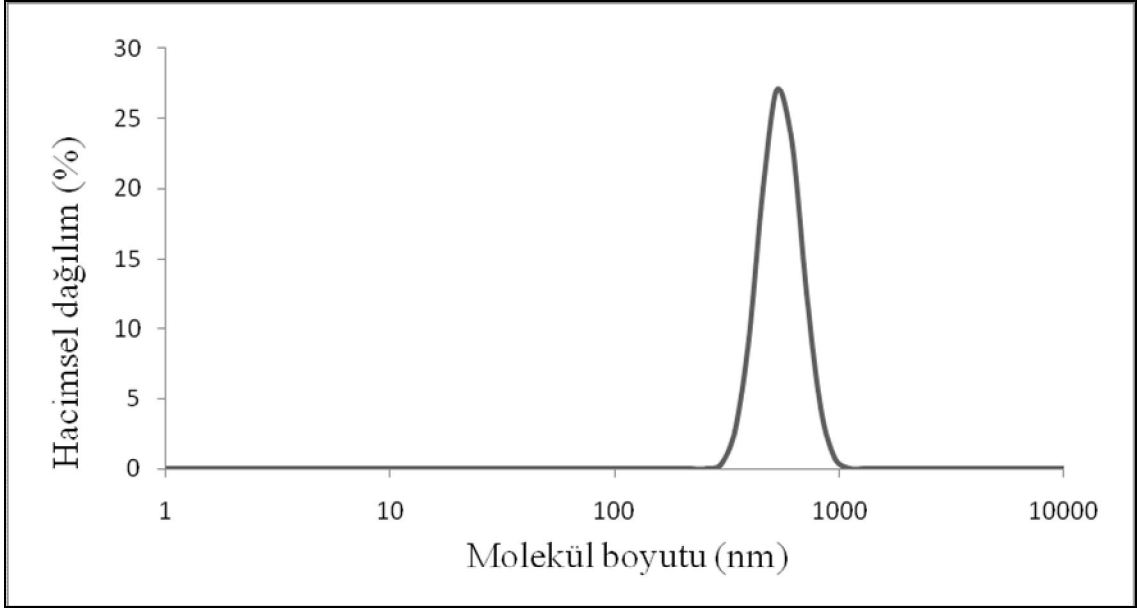
Kafeik asitin molekül boyutu % 100'ü 727 nm olarak ölçüldü.



Şekil 4.4. Nano kafeik asitin molekül boyutu

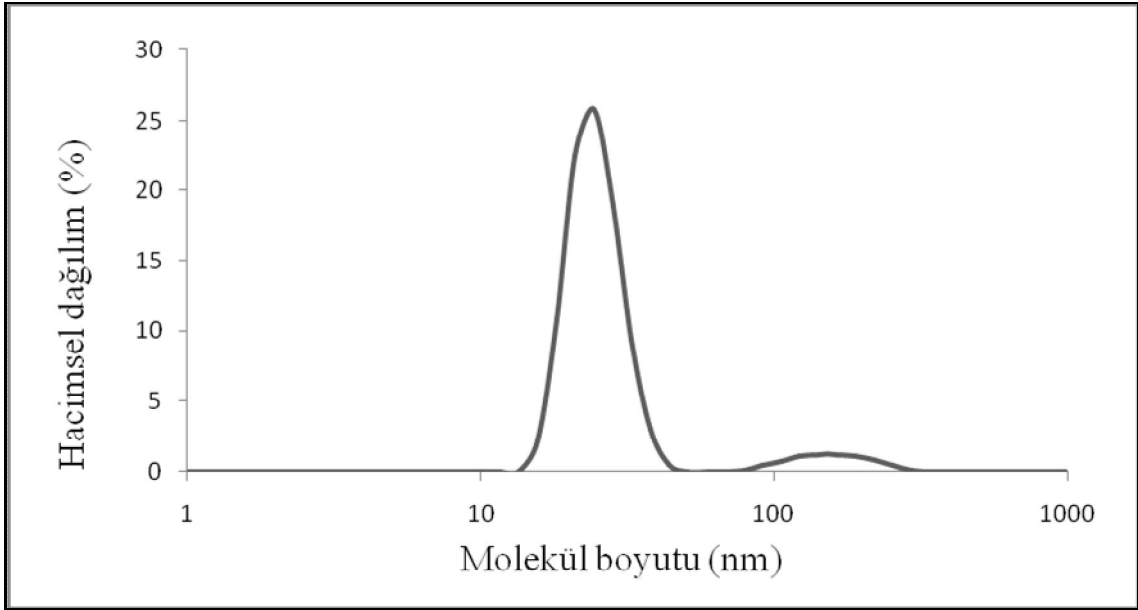
Nano kafeik asitin molekül boyutu % 59.8 19.4 nm, % 40.2'si 527 nm olarak ölçüldü. Kafeik asitin nano boyuta getirildiği görüldü.

4.1.3. p-Kumarik Asitin Boyut Ölçümleri



Şekil 4.5. p-Kumarik asitin molekül boyutu

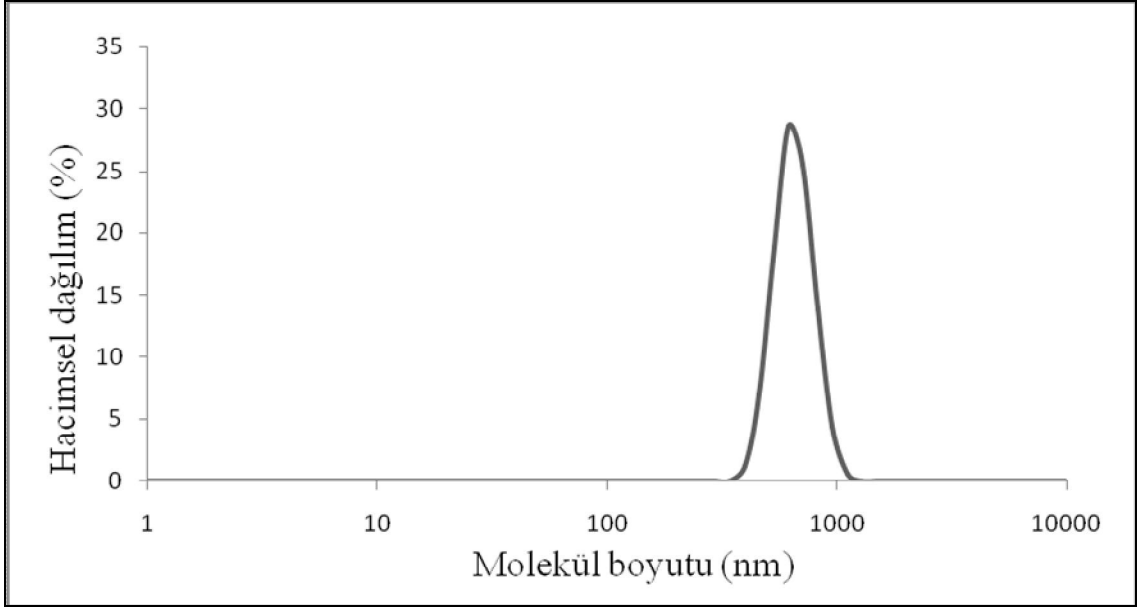
p-Kumarik asitin molekül boyutu 556 nm olarak ölçüldü.



Şekil 4.6. Nano p-Kumarik asitin molekül boyutu

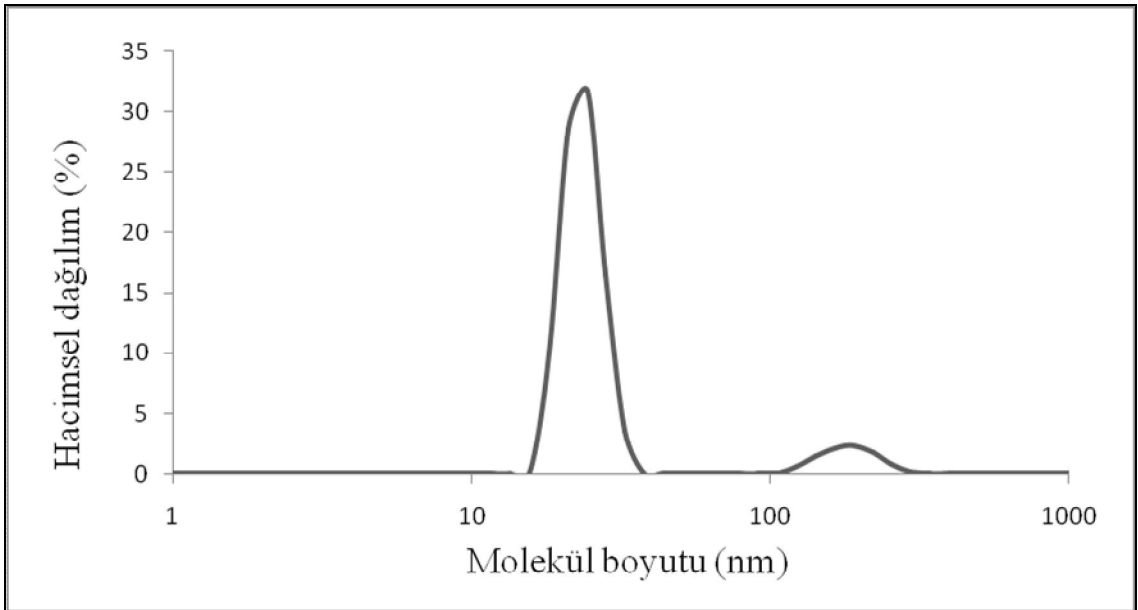
Nano p-kumarik asitin molekül boyutu % 93.1 24.8 nm, % 6.9'u 160 nm olarak ölçüldü. p-Kumarik asitin nano boyuta getirildiği görüldü.

4.1.4. Dopaminin Boyut Ölçümleri



Şekil 4.7. Dopaminin molekül boyutu

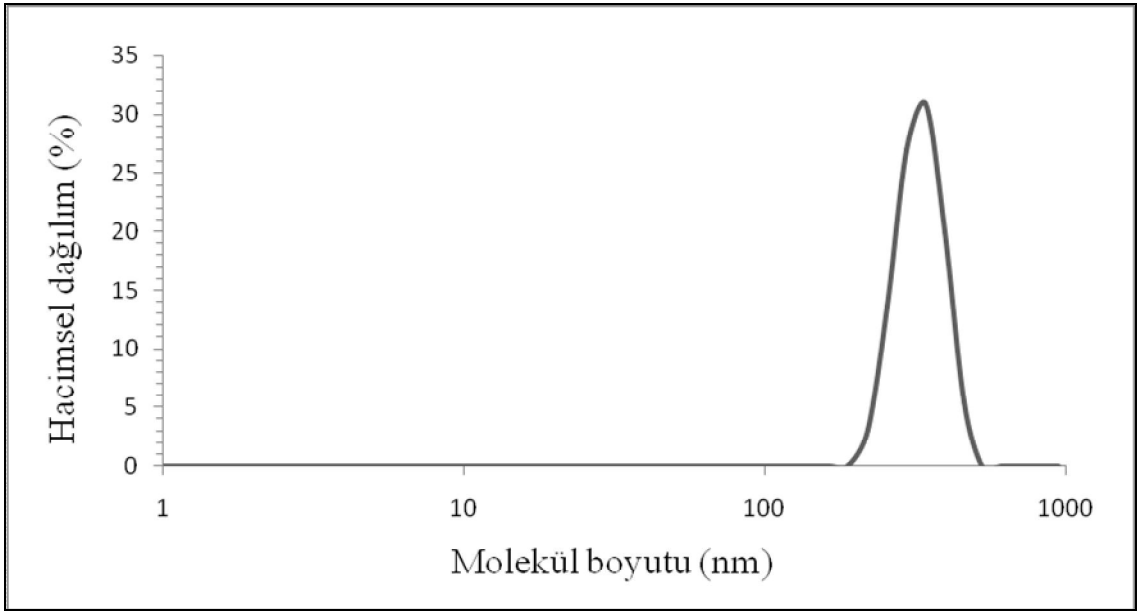
Dopaminin molekül boyutu 657 nm olarak ölçüldü.



Şekil 4.8. Nano Dopaminin molekül boyutu

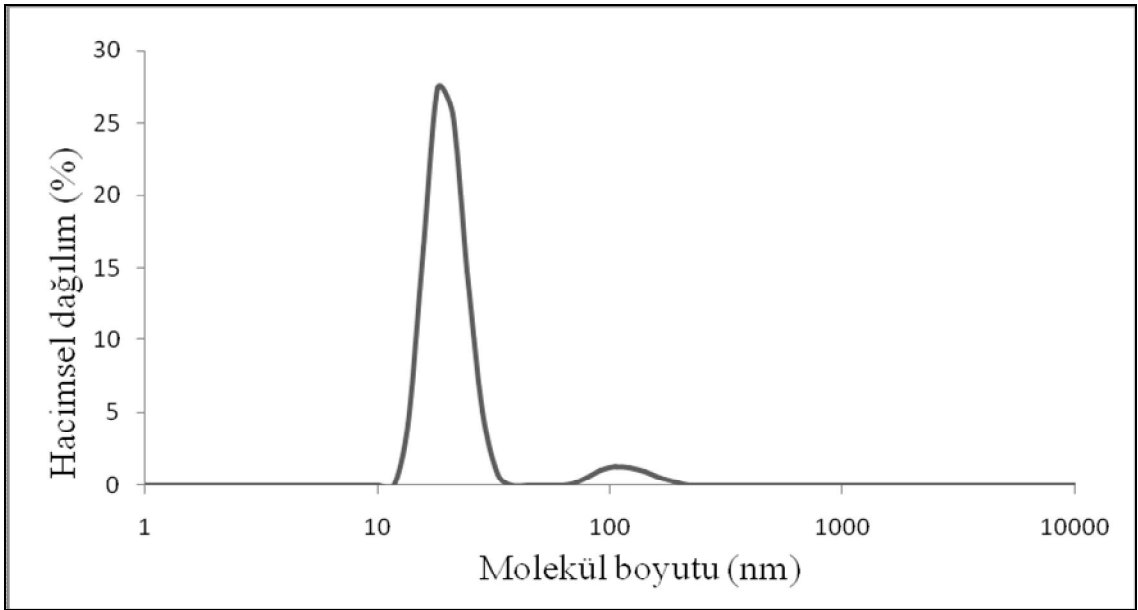
Nano Dopaminin molekül boyutu % 90.8'i 23.6 nm, % 9.2'si 185 nm olarak ölçüldü. Dopaminin nano boyuta getirildiği görüldü.

4.1.5.4-Metil Kateşol Boyut Ölçümleri



Şekil 4.9. 4-Metil kateşolün molekül boyutu

4-Metil kateşolün molekül boyutunun %100 331 nm olarak ölçüldü.

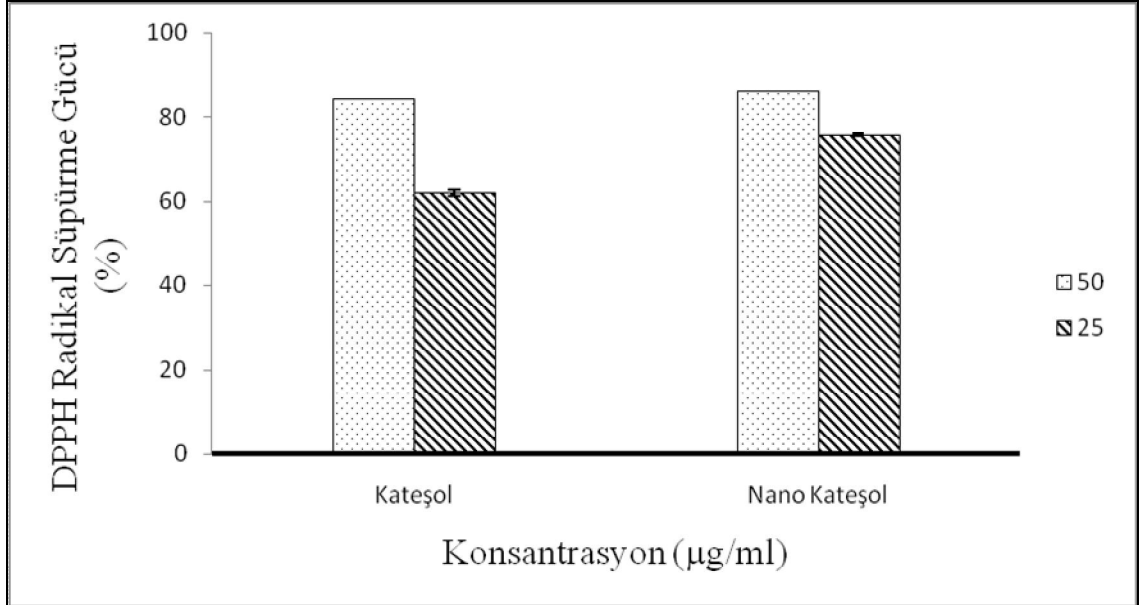


Şekil 4.10. Nano 4-metil kateşolün molekül boyutu

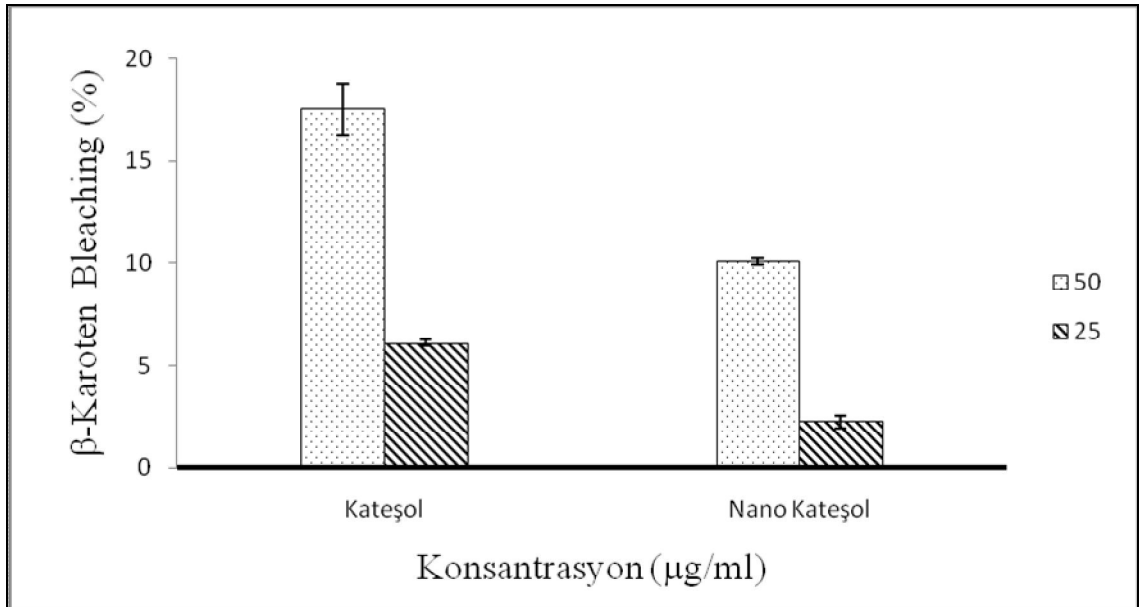
Nano 4-metil kateşolün molekül boyutunun % 94.3'ü 20 nm, % 5.7'si 117 nm olarak ölçüldü. 4-Metil kateşolün nano boyuta getirildiği görüldü.

4.2. Polifenollerin Antioksidan Aktivitelerinin *in vitro* Olarak Karşılaştırılması İncelenmesi

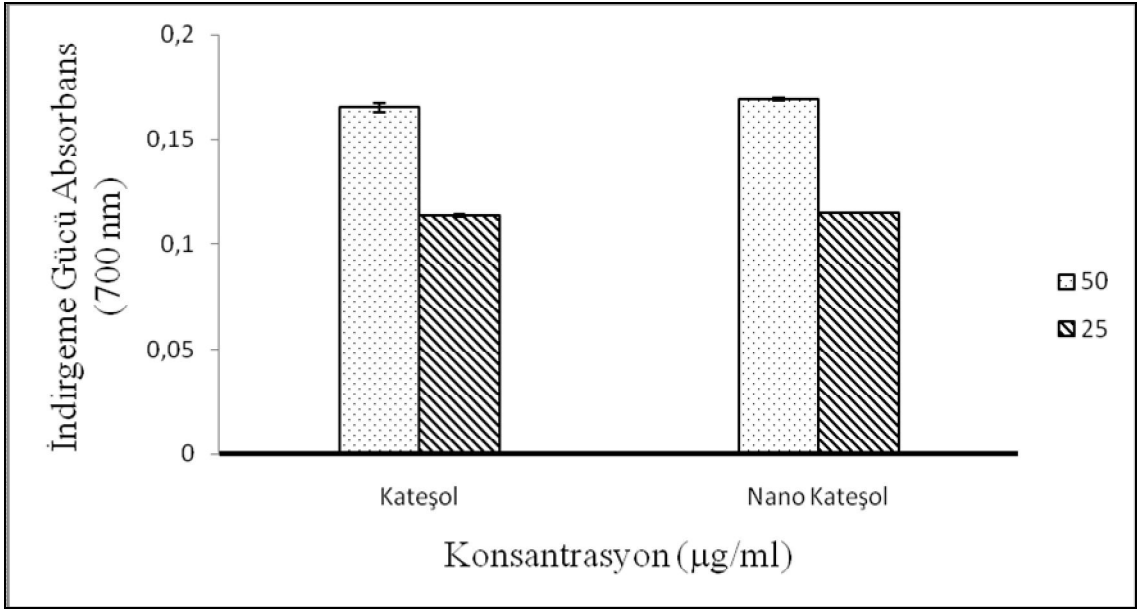
4.2.1. Kateşol ve Nano Kateşolün Antioksidan Aktivitelerinin *in vitro* Olarak Karşılaştırılması



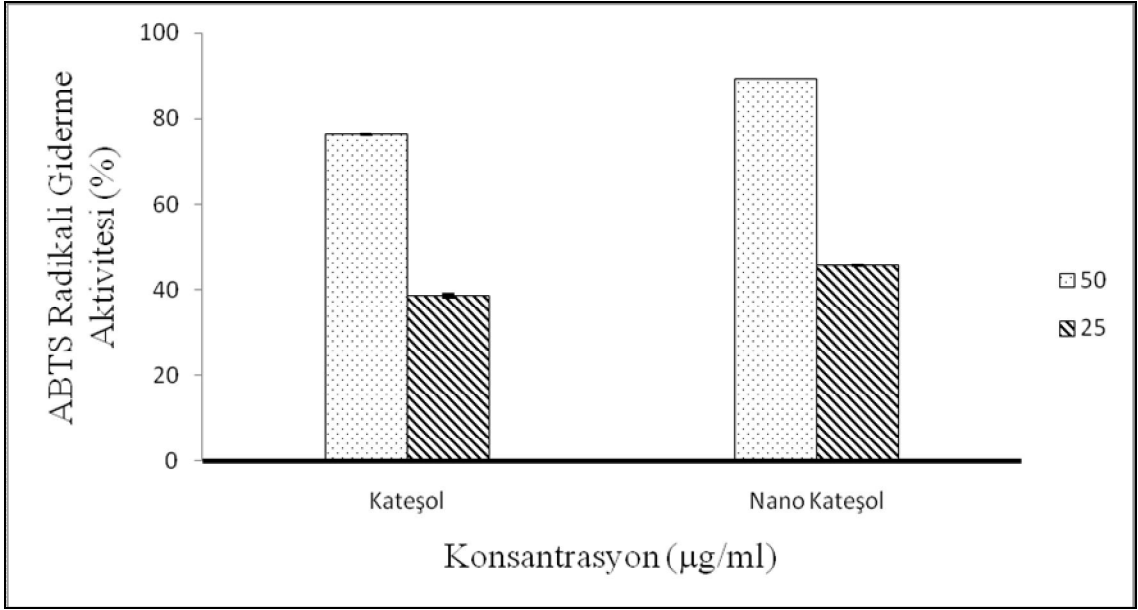
Şekil 4.11. Kateşol ve nano kateşol DPPH radikal süpürme gücü testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



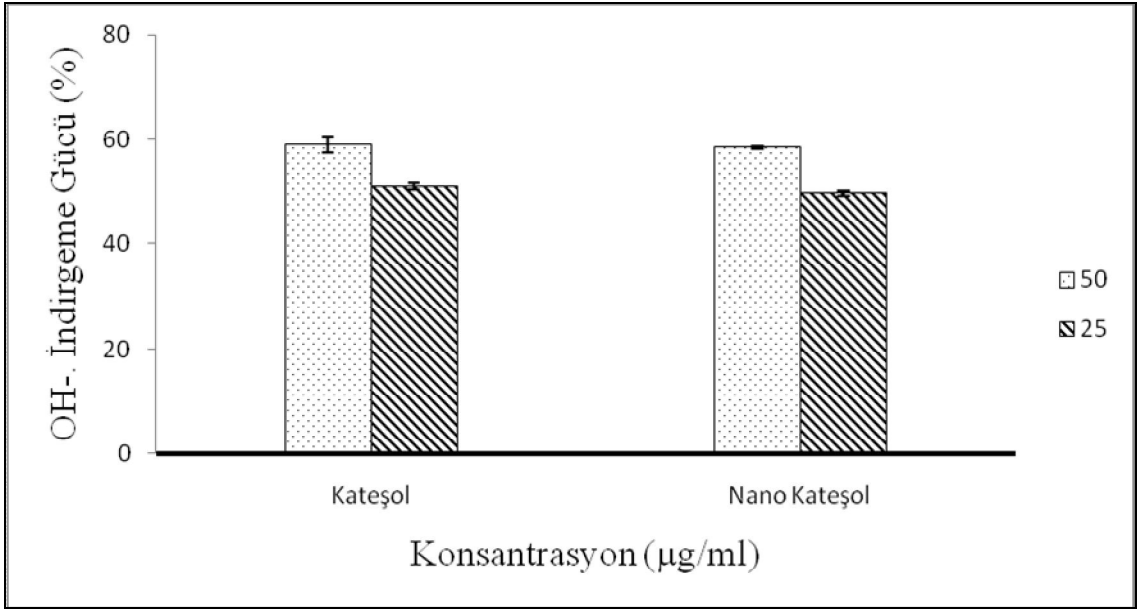
Şekil 4.12. Kateşol ve nano kateşol β-karoten bleaching testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.13. Kateşol ve nano kateşol indirgeme gücü testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.14. Kateşol ve nano kateşol ABTS radikal giderme aktivitesi testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.15. Kateşol ve nano kateşol OH[·] indirgeme gücü testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Kateşol ve nano kateşol 50 µl ve 25 µl konsantrasyonda DPPH, β-karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite testleri uygulandı.

DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde kateşol 50 µl'de % 84.30'lik bir aktivite gösterirken, nano kateşol % 86.17'lik bir aktivite gösterdi. Kateşol 25 µl'de % 61.96'lik bir aktivite gösterirken, nano kateşol % 75.61'lik bir aktivite gösterdi. DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen kateşolün, temel boyuttaki kateşolden %13.65 daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü.

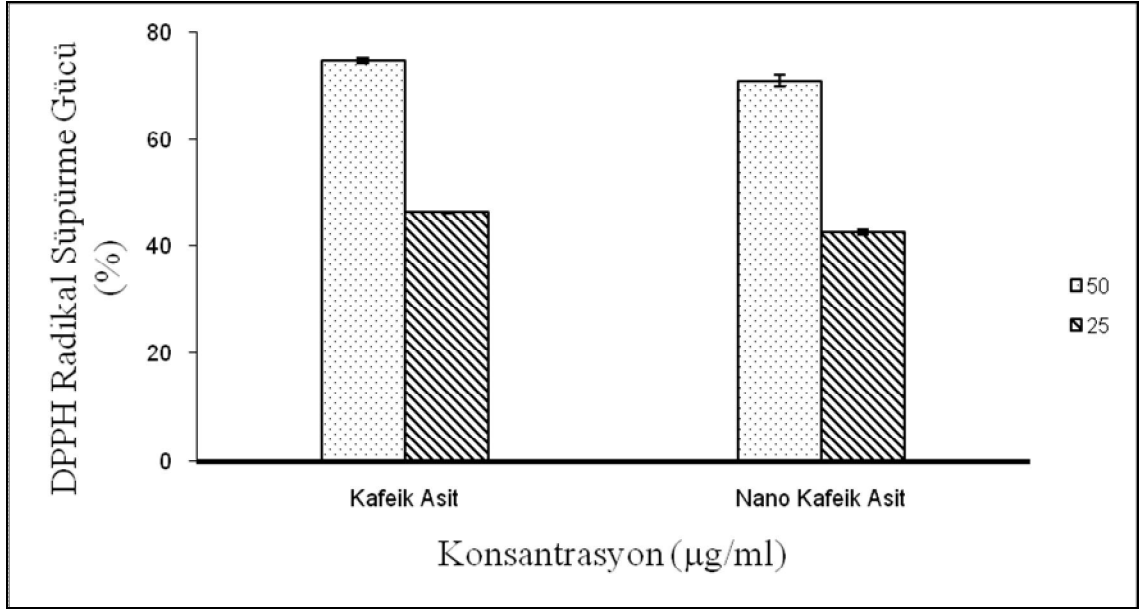
β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde kateşol 50 µl'de % 17.56'lik bir engelleme yaparken, nano kateşol % 10.11'lik bir engelleme gösterdi. Kateşol 25 µl'de % 6.11'lik bir engelleme yaparken, nano kateşol % 2.22'lik bir engelleme gösterdi. β-Karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde kateşolün, nano kateşolden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ölçüldü.

İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde kateşol 50 µl'de 0.165 abs indirgeme yaparken, nano kateşol 0.169 abs indirgeme yaptı. Kateşol 25 µl'de 0.114 abs indirgeme yaparken, nano kateşol 0.115 abs indirgeme yaptı. İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen kateşol, temel boyuttaki kateşolle yaklaşık aynı etkiyi gösterdi.

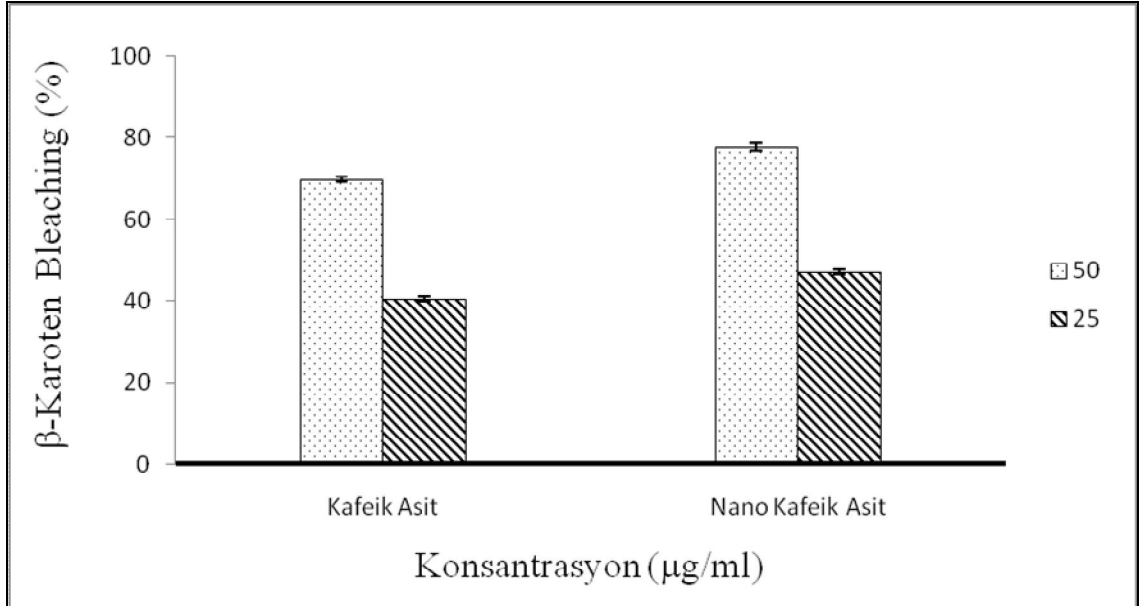
ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümlerinde kateşol 50 µl'de % 76.23'lik bir aktivite gösterirken, nano kateşol % 89.17'lik bir aktivite gösterdi. Kateşol 25 µl'de % 38.66'lik bir aktivite gösterirken, nano kateşol % 45.78'lik bir aktivite gösterdi. ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen kateşolün, temel boyuttaki kateşolden % 12.94 daha fazla antioksidan aktivite elde edildi.

OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde kateşol 50 µl'de % 58.93'lük bir indirgeme yaparken, nano kateşol % 58.45'lik bir indirgeme yaptı. Kateşol 50 µl'de % 50.95'lik bir indirgeme yaparken, nano kateşol % 49.64'lük bir indirgeme yaptı. OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen kateşol, temel boyuttaki kateşol ile yaklaşık aynı etkiye sahip olduğu görüldü.

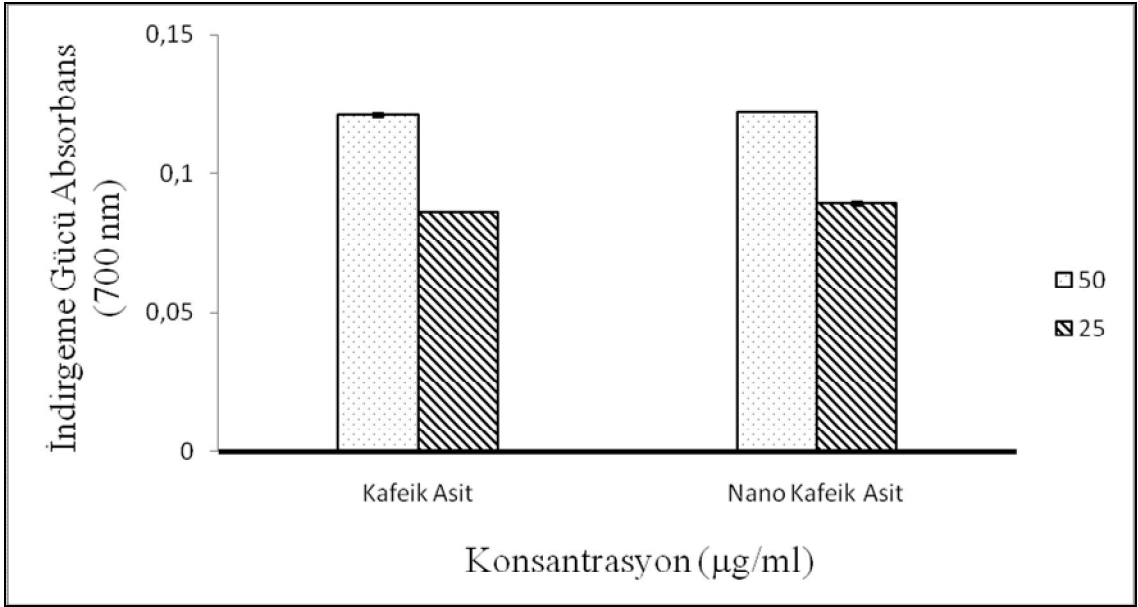
4.2.2.Kafeik Asit ve Nano Kafeik Asitin Antioksidan Aktivitelerin *in vitro* Olarak Karşılaştırılması



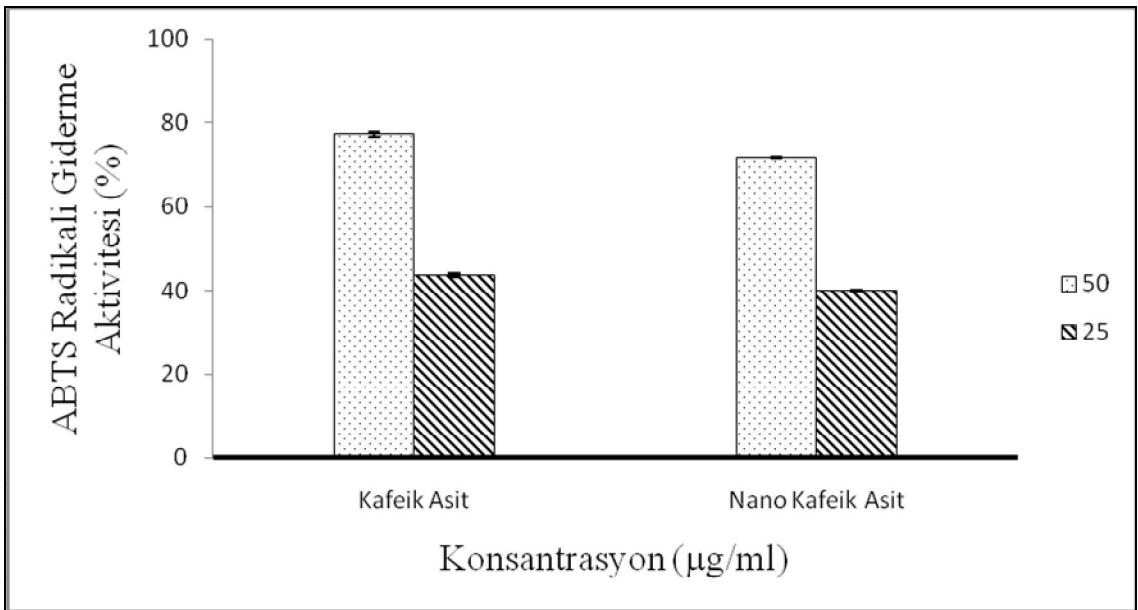
Şekil 4.16. Kafeik asit ve nano kafeik asit DPPH radikal süpürme gücü testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



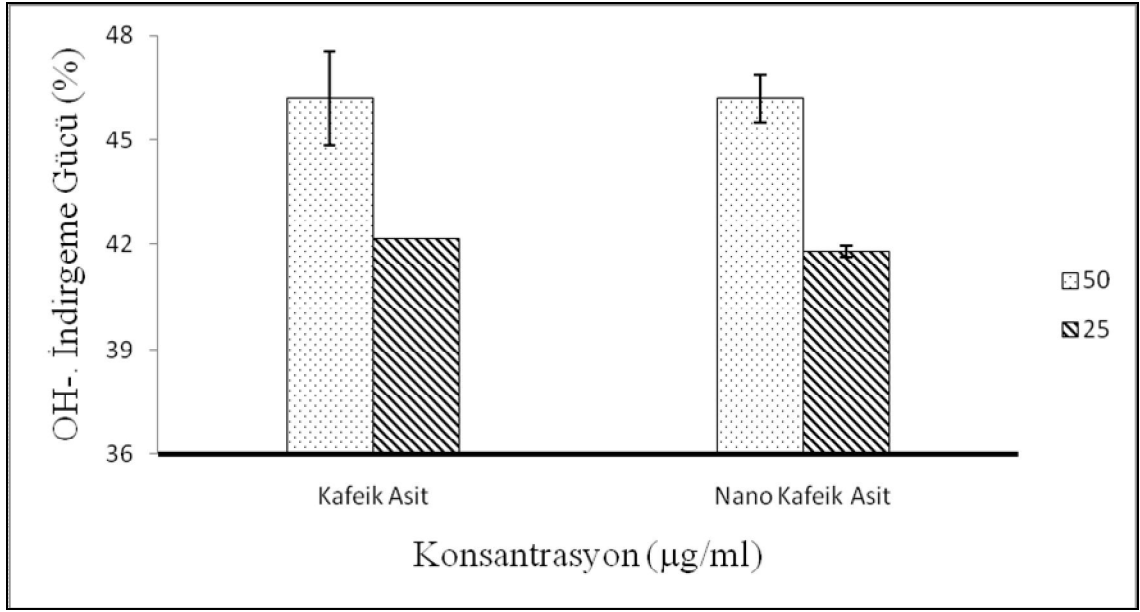
Şekil 4.17. Kafeik asit ve nano kafeik asit β-karoten bleaching testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.18. Kafeik asit ve nano kafeik asit indirgeme gücü karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.19. Kafeik asit ve nano kafeik asit ABTS radikal giderme testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.20. Kafeik asit ve nano kafeik asit OH⁻ indirgeme gücü testinin karşılaştırılması. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Kafeik asit ve nano kafeik asit 50 µl ve 25 µl konsantrasyonda DPPH, β-karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH⁻ indirgeme gücü antioksidan aktivite testleri uygulandı.

DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde kafeik asit 50 µl'de % 74.77'lik bir aktivite gösterirken, nano kafeik asit % 71.03'lük bir aktivite gösterdi. Kafeik asit 25 µl'de % 46.45'lik bir aktivite gösterirken, nano kafeik asit % 42.71'lik bir aktivite gösterdi. DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda kafeik asitin, nano boyuta getirilen kafeik asitten daha fazla antioksidan aktivite gösterdi.

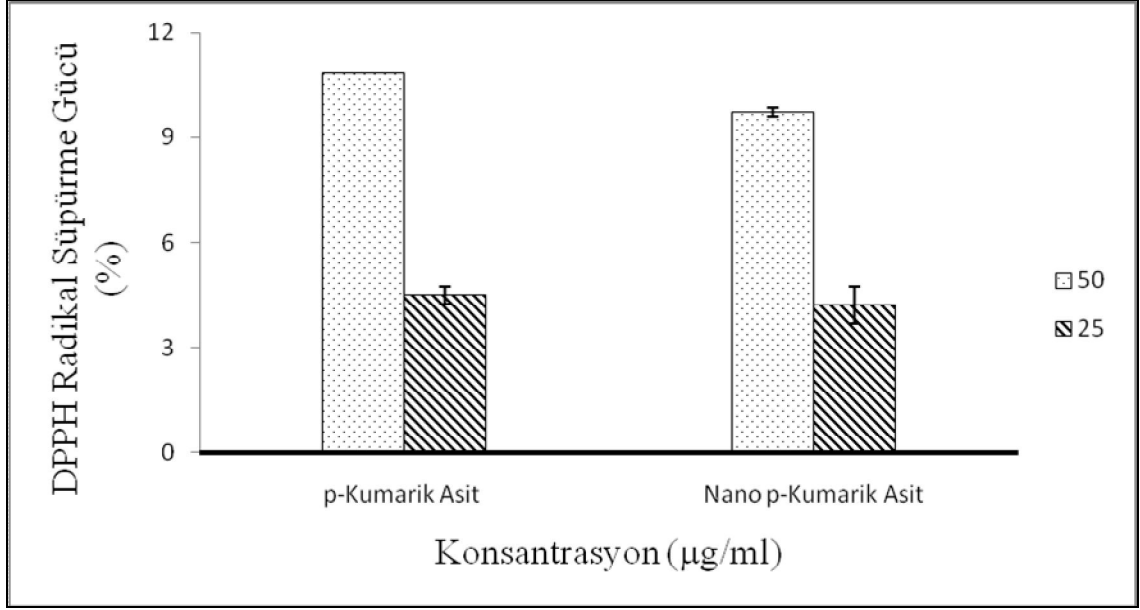
β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde kafeik asit 50 µl'de % 70.00'lik bir engelleme yaparken, nano kafeik asit % 77.78'lik bir engelleme yaptı. Kafeik asit 25 µl'de % 40.44'lik bir engelleme yaparken, nano kafeik asit % 47.11'lik bir engelleme yaptı. β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde nano kafeik asitin, temel boyuttaki kafeik asitten daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü.

İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde kafeik asit 50 µl'de 0.121 abs indirgeme yaparken, nano kafeik asit 0.122 abs indirgeme yaptı. Kafeik asit 25 µl'de 0.086 abs indirgeme yaparken, nano kafeik asit 0.089 abs indirgeme yaptı. İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen kafeik asitin, temel boyuttaki kafeik asitle yaklaşık aynı antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna ulaşıldı.

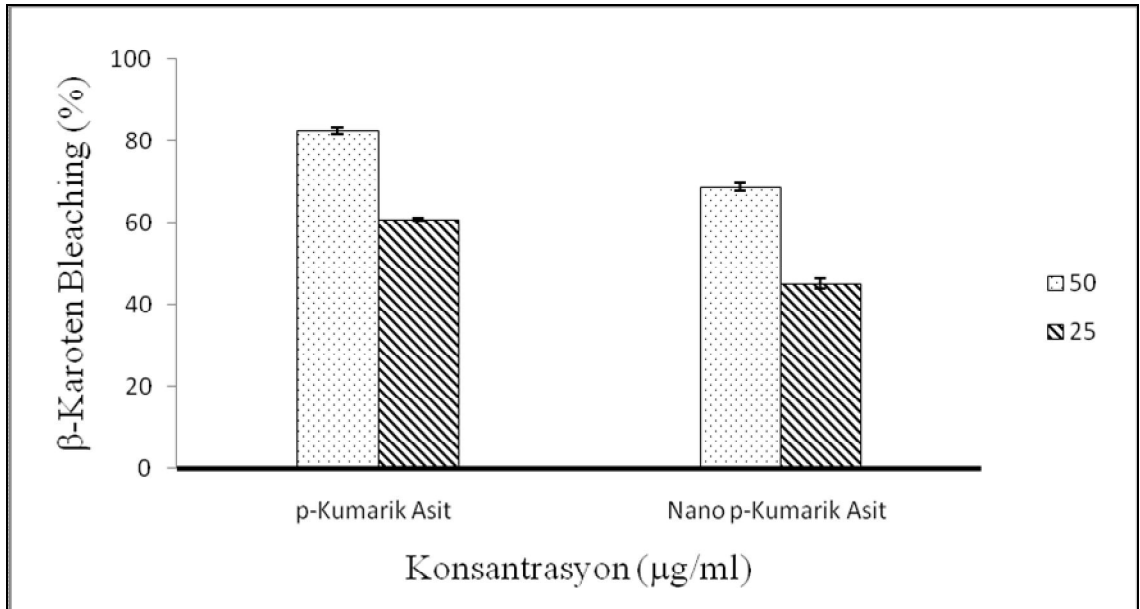
ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümlerinde kafeik asit 50 µl'de % 77.18'lik bir aktivite gösterirken, nano kafeik asit % 71.37'lik bir aktivite gösterdi. Kafeik asit 25 µl'de % 43.60'lık bir aktivite gösterirken, nano kafeik asit % 39.97'lik bir aktivite gösterdi. ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümleri sonunda kafeik asitte, nano boyuta getirilen kafeik asitten daha fazla antioksidan aktivite ölçüldü.

OH⁻ indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde kafeik asit 50 µl'de % 46.19'lik bir indirgeme yaparken, nano kafeik asit % 46.19'lik bir indirgeme yaptı. Kafeik asit 25 µl'de % 42.14'lik bir indirgeme yaparken, nano kafeik asit % 41.78'lik bir indirgeme yaptı. OH⁻ indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen kafeik asitin, temel boyuttaki kafeik asitle yaklaşık aynı etkiye sahip olduğu görüldü.

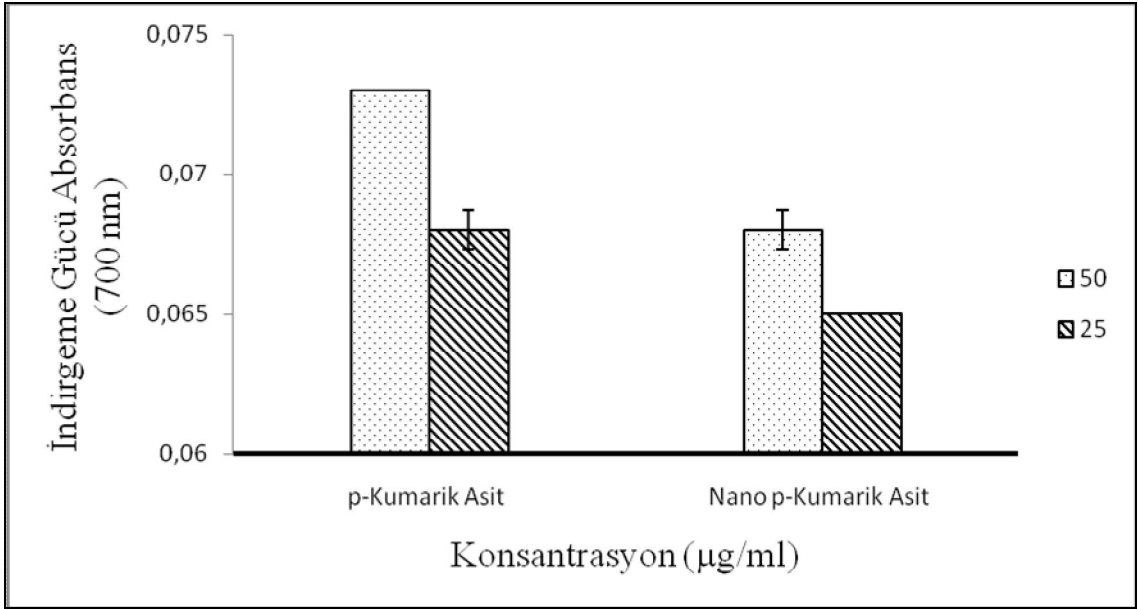
4.2.3. p-Kumarik Asit ve Nano p-Kumarik Asitin Antioksidan Aktivitelerin *in vitro* Olarak Karşılaştırılması



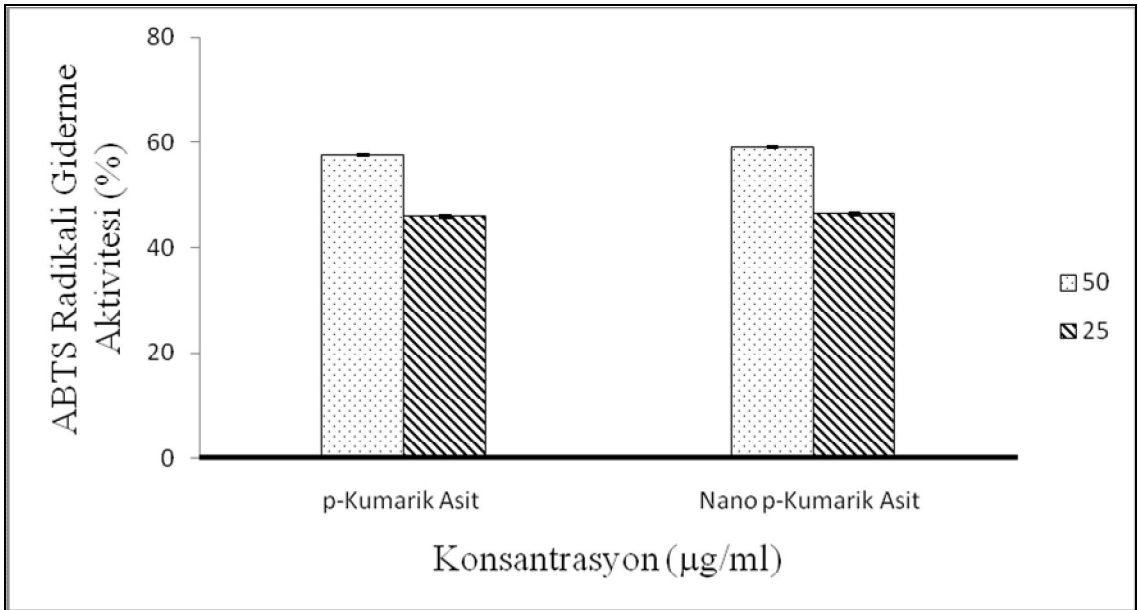
Şekil 4.21. p-Kumarik asit ve nano p-kumarik asit DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivitesi ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



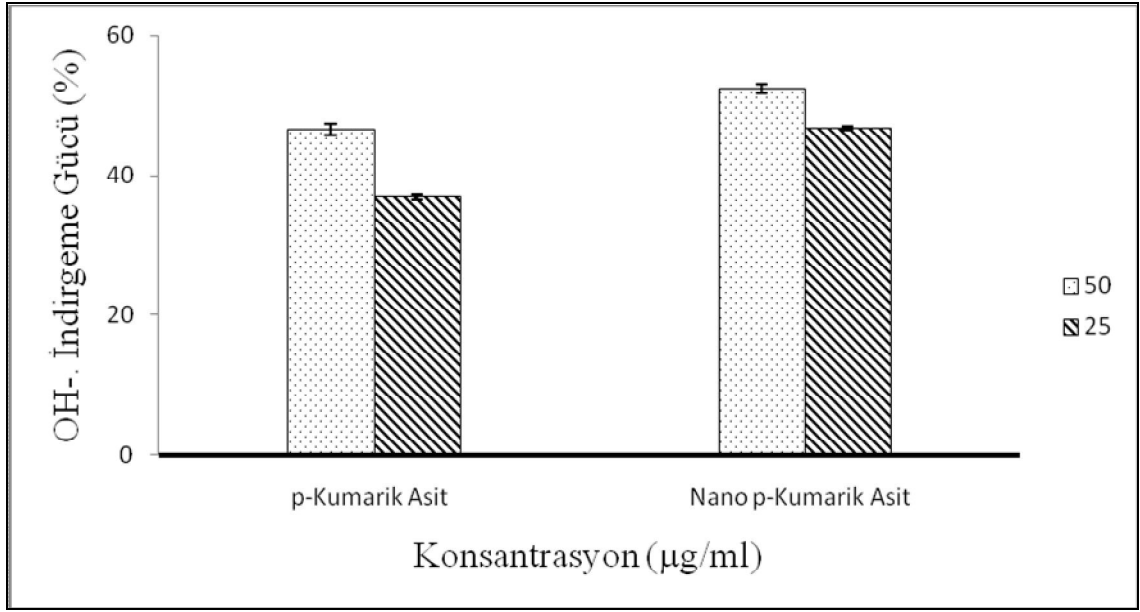
Şekil 4.22. p-Kumarik asit ve nano p-kumarik asit β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.23. p-Kumarik asit ve nano p-kumarik asit indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.24. p-Kumarik asit ve nano p-kumarik asit ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.25. p-Kumarik asit ve nano p-kumarik asit OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

p-Kumarik asit ve nano p-kumarik asit 50 µl ve 25 µl konsantrasyonda DPPH, β-karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite testleri uygulandı.

DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde p-kumarik asit 50 µl'de % 10.84'lik bir aktivite gösterirken, nano p-kumarik asit % 9.72'lik bir aktivite gösterdi. p-Kumarik asit 25 µl'de % 4.49'luk bir aktivite gösterirken, nano p-kumarik asit % 4.21'lik bir aktivite gösterdi. DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda, temel boyuttaki p-kumarik asit, nano boyuta getirilen p-kumarik asitten daha fazla antioksidan aktivite elde edildi.

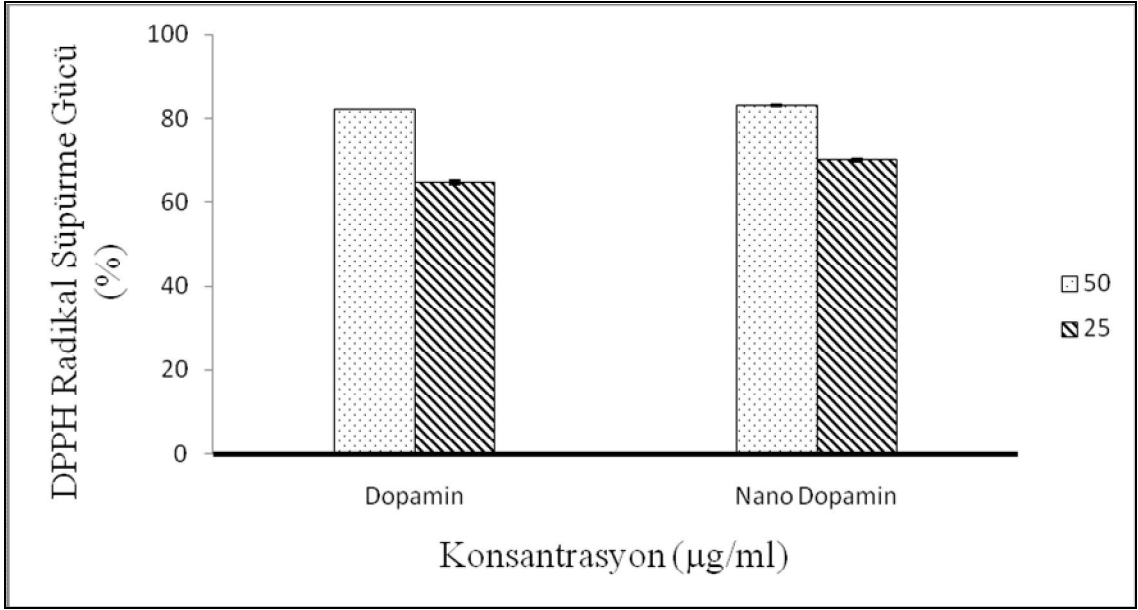
β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde p-kumarik asit 50 µl'de % 82.56'lik bir engelleme yaparken, nano p-kumarik asit % 68.67'lik bir engelleme yaptı. p-Kumarik asit 25 µl'de % 60.89'lik bir engelleme yaparken, nano p-kumarik asit % 45.11'lik bir engelleme yaptı. β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde temel boyuttaki p-kumarik asit, nano boyuta getirilen p-kumarik asitten daha fazla antioksidan aktivite gösterdi.

İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde p-kumarik asit 50 µl'de 0.073 abs indirgeme yaparken, nano p-kumarik asit 0.068 abs indirgeme yaptı. p-Kumarik asit 25 µl'de 0.068 abs indirgeme yaparken, nano p-kumarik asit 0.065 abs indirgeme yaptı. İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde p-kumarik asit, nano boyuta getirilen p-kumarik asitten daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşıldı.

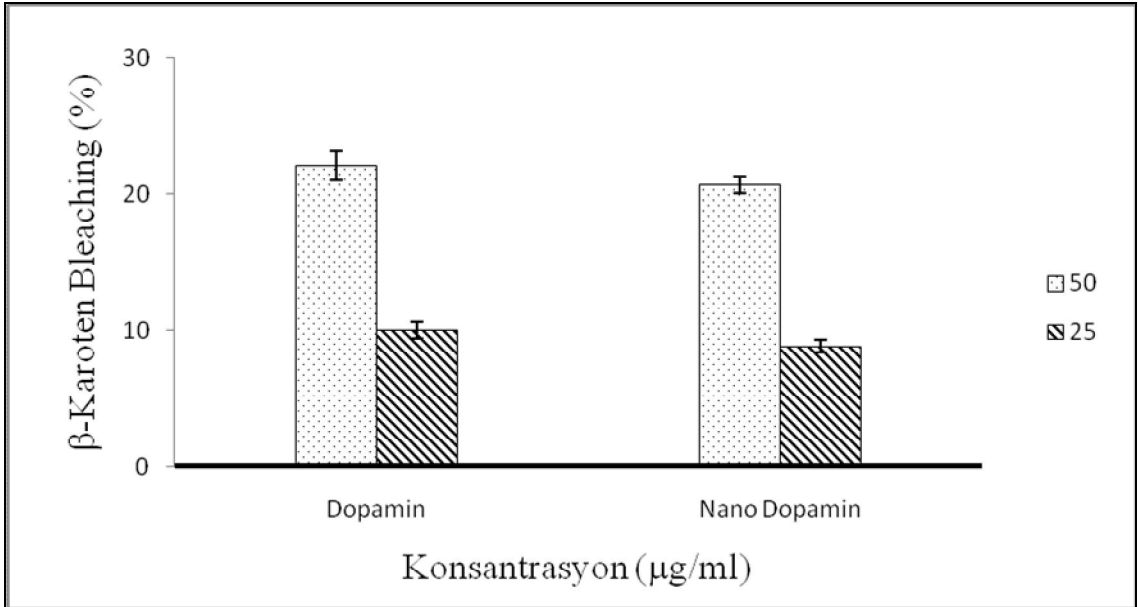
ABTS Radikal giderme antioksidan aktivite ölçümlerinde p-kumarik asit 50 μ l'de % 57.63'lük bir aktivite gösterirken, nano p-kumarik asit % 59.09'luk bir aktivite göstermiştir. p-Kumarik asit 25 μ l'de % 46.01'lik bir aktivite gösterirken, nano p-kumarik asit % 46.51'lik bir aktivite göstermiştir. ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen p-kumarik asitin, temel boyuttaki p-kumarik asitten daha fazla antioksidan aktivite gösterdi.

OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde p-kumarik asit 50 μ l'de % 46.55'lik bir indirgeme yaparken, nano p-kumarik asit % 52.38'lik bir indirgeme yaptı. p-Kumarik asit 25 μ l'de % 36.90'lık bir indirgeme yaparken, nano p-kumarik asit % 46.67'lik bir indirgeme yaptı. OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen p-kumarik asitin, temel boyuttaki p-kumarik asitten % 9.23 daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ortaya kondu.

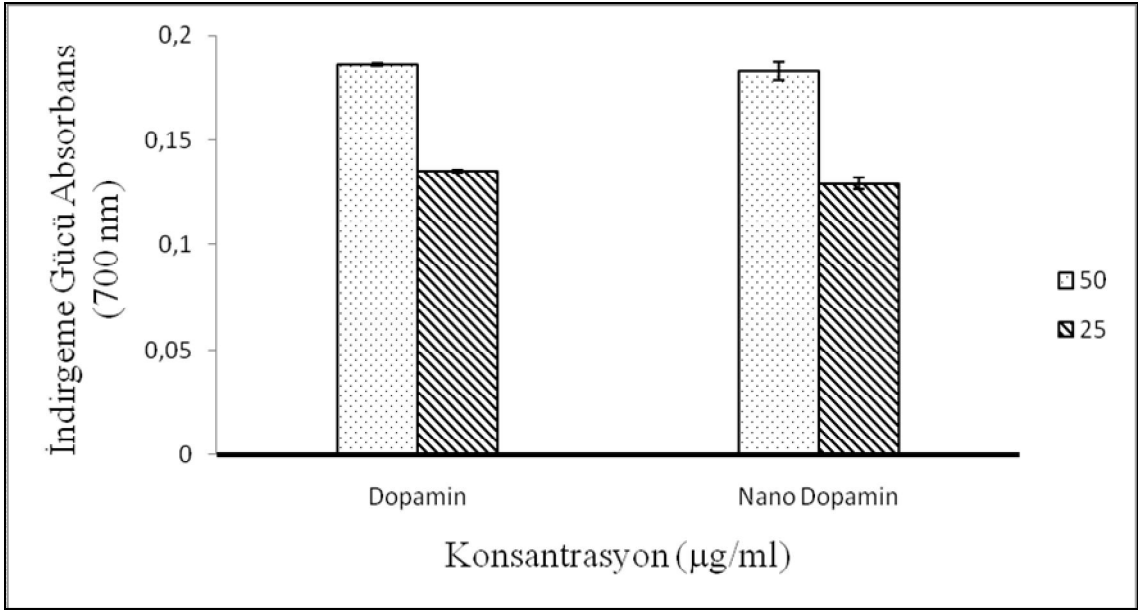
4.2.4. Dopamin ve Nano Dopaminin Antioksidan Aktivitelerin *in vitro* Olarak Karşılaştırılması



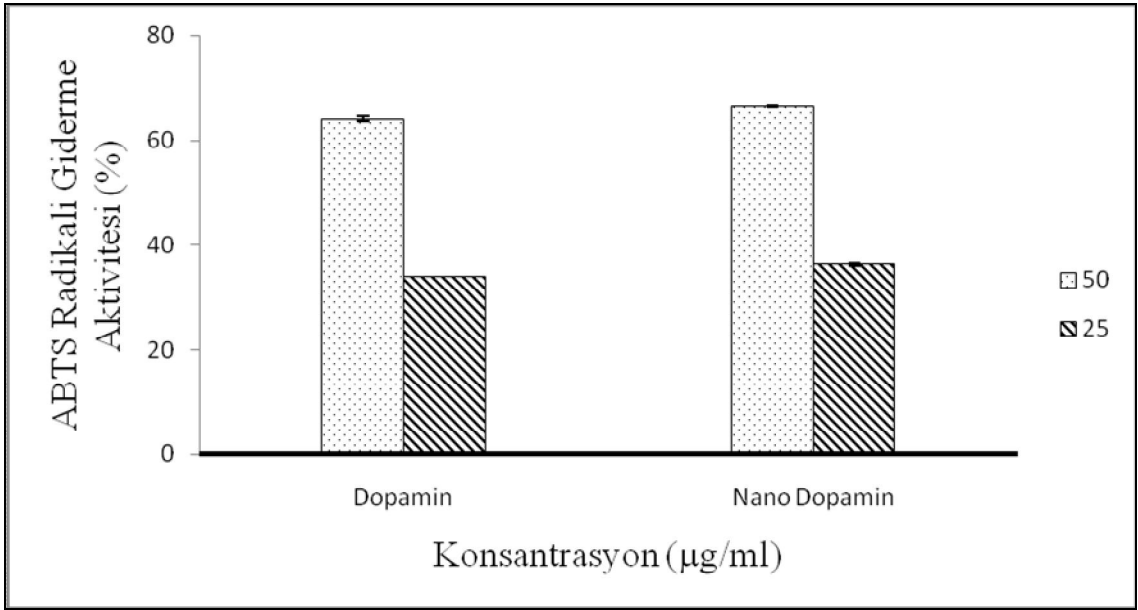
Şekil 4.26. Dopamin ve nano dopaminin DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



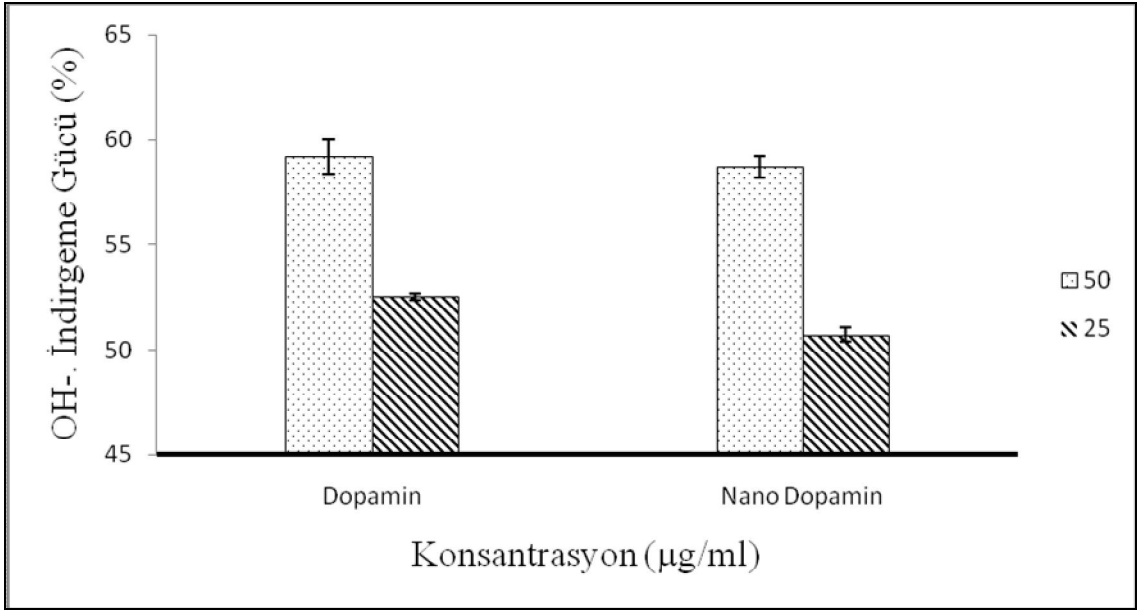
Şekil 4.27. Dopamin ve nano dopamin β -karoten bleaching antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.28. Dopamin ve nano dopamin indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.29. Dopamin ve nano dopamin ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.30. Dopamin ve nano dopaminin OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

Dopamin ve nano dopamin 50 µl ve 25 µl konsantrasyonda DPPH, β-karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite testleri uygulandı.

DPPH Radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde dopamin 50 µl'de % 81.96'lık bir aktivite gösterirken, nano dopamin % 83.09'luk bir aktivite gösterdi. Dopamin 25 µl'de % 64.67'lik bir aktivite gösterirken, nano dopamin % 70.00'lik bir aktivite gösterdi. DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen dopaminin, temel boyuttaki dopaminden % 5.33 daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü.

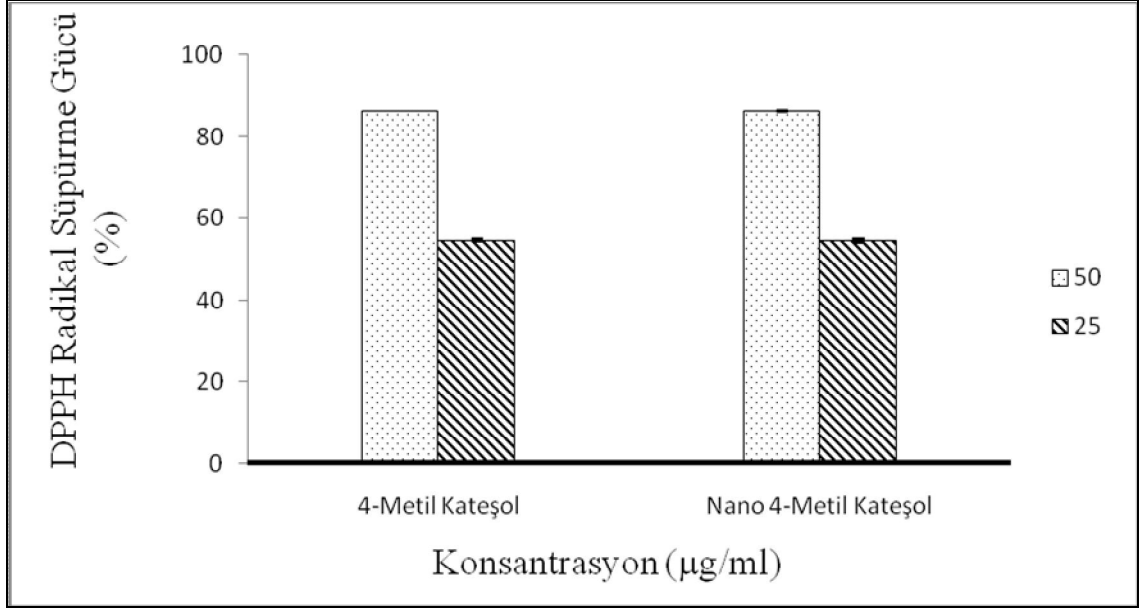
β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde dopamin 50 µl'de % 22.11'lik bir engelleme gösterirken, nano dopamin % 20.67'lik bir engelleme gösterdi. Dopamin 25 µl'de % 10.00'luk bir engelleme gösterirken, nano dopamin % 8.78'lik bir engelleme gösterdi. β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde dopamin, nano dopaminden daha fazla antioksidan aktivite gösterdi.

İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde dopamin 50 µl'de 0.186 abs indirgeme yaparken, nano dopamin 0.183 abs indirgeme yaptı. Dopamin 25 µl'de 0.135 abs indirgeme yaparken, nano dopamin 0.129 abs indirgeme yaptı. İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda dopaminin, nano dopaminden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ölçüldü.

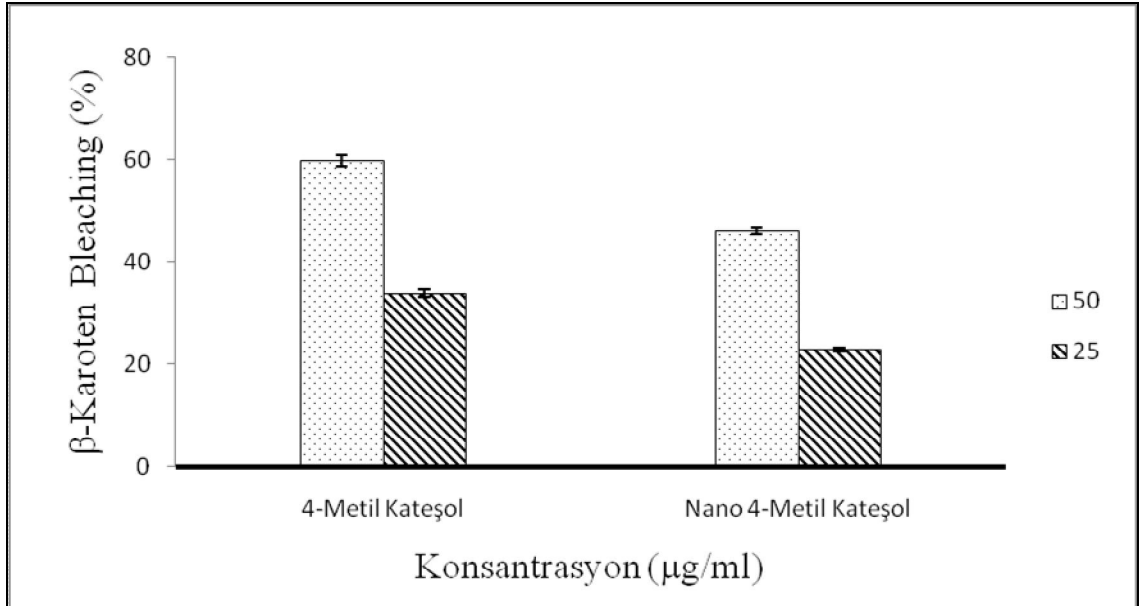
ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümlerinde dopamin 50 µl'de % 64.10'luk bir aktivite gösterirken, nano dopamin % 66.50'lik bir aktivite gösterdi. Dopamin 25 µl'de % 34.01'lik bir aktivite gösterirken, nano dopamin % 36.27'lik bir aktivite gösterdi. ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen dopaminin, temel boyuttaki dopaminden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ortaya kondu.

OH⁻ indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde dopamin 50 µl'de % 59.17'lik bir indirgeme yaparken, nano dopamin % 58.69'lik bir indirgeme yaptı. Dopamin 25 µl'de % 52.50'lik bir indirgeme yaparken, nano dopamin % 50.72'lik bir indirgeme yaptı. OH⁻ indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen dopaminin, temel boyuttaki dopaminle yaklaşık aynı etkiye sahip olduğu görüldü.

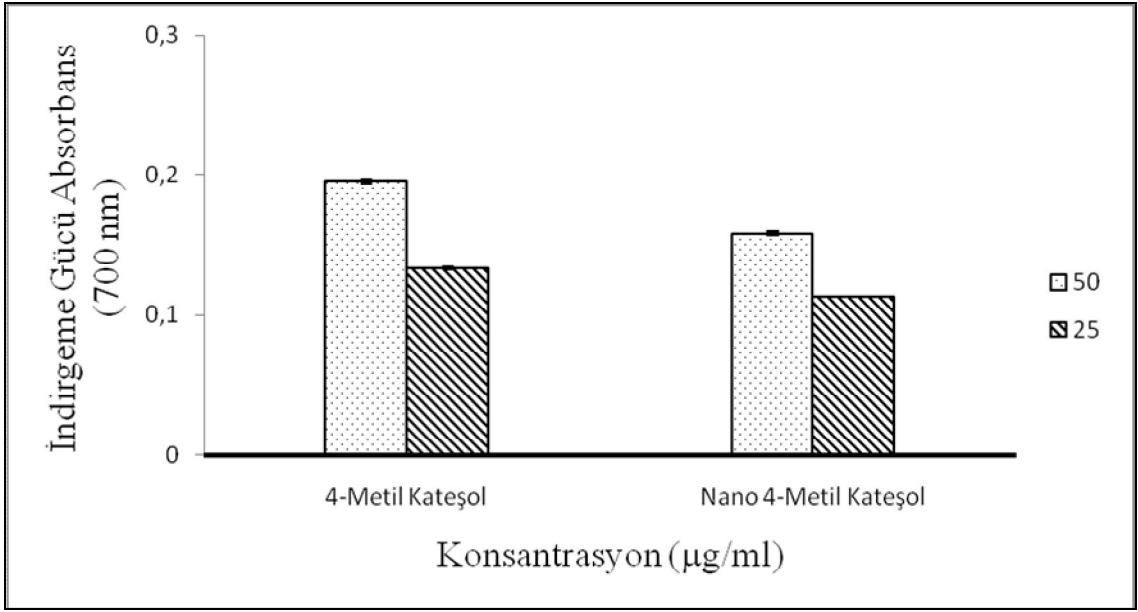
4.2.1. 4-Metil Kateşol ve Nano 4-Metil Kateşolün Antioksidan Aktivitelerin *in vitro* Olarak Karşılaştırılması



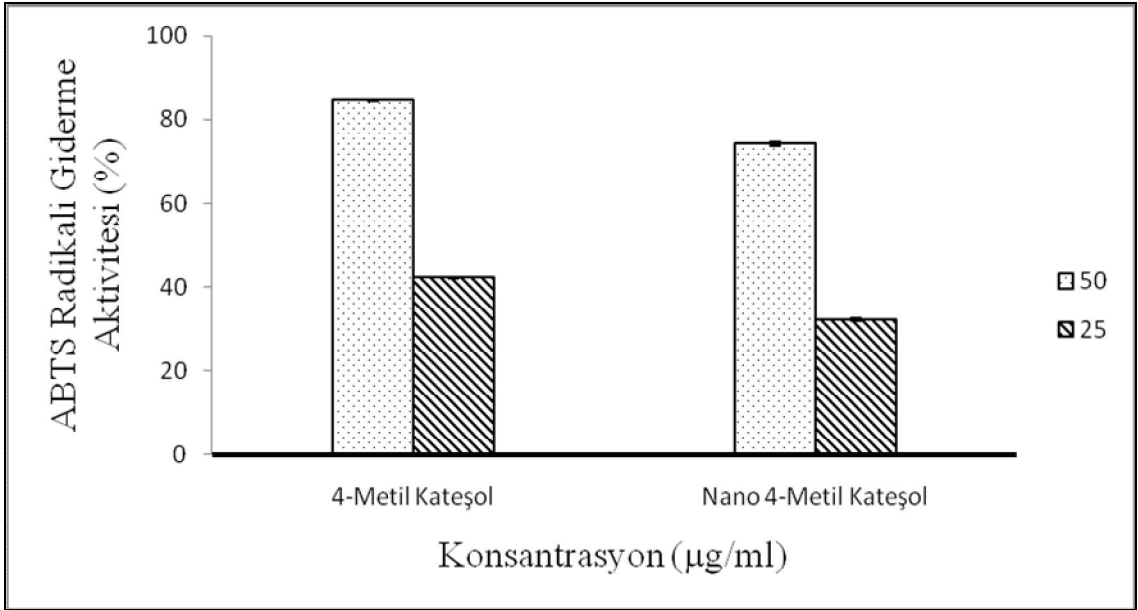
Şekil 4.31. 4-Metil kateşol ve nano 4-metil kateşolün DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



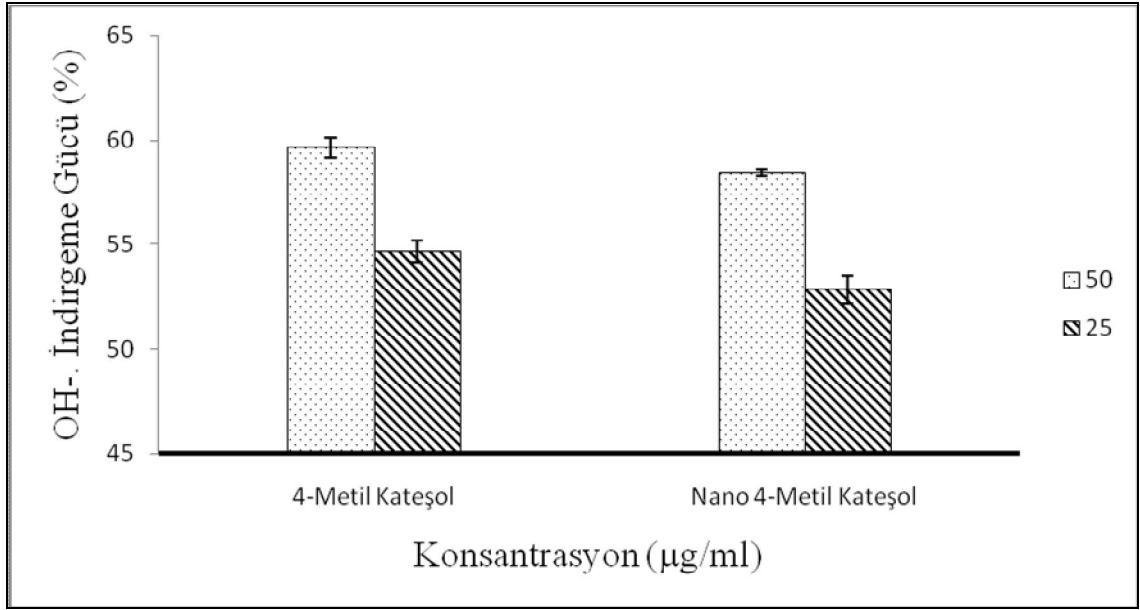
Şekil 4.32. 4-Metil kateşol ve nano 4-metil kateşol β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.33. 4-Metil kateşol ve nano 4-metil kateşol indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.34. 4-Metil kateşol ve nano 4-metil kateşol ABTS radikali giderme antioksidan aktivite ölçüm testinin karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir



Şekil 4.35. 4-Metil kateşol ve nano 4-metil kateşol OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçüm testinin antioksidan aktivite karşılaştırılması grafiği. Her veri iki bağımsız tekrarın ortalaması olup, hata çubukları standart hataları ifade etmektedir

4-Metil kateşol ve nano 4-metil kateşol 50 µl ve 25 µl konsantrasyonda DPPH, β-karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH[·] indirgeme gücü antioksidan aktivite testleri uygulandı.

DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde 4-metil kateşol 50 µl'de % 86.17'lik bir aktivite gösterirken, nano 4-metil kateşol % 86.26'lık bir aktivite gösterdi. 4-metil kateşol 25 µl'de % 54.58'lik bir aktivite gösterirken, nano 4-metil kateşol % 54.39'luk bir aktivite gösterdi. DPPH radikal süpürme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen 4-metil kateşolün, temel boyuttaki 4-metil kateşolle yaklaşık aynı etkiyi gösterdi.

β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde 4-metil kateşol 50 µl'de % 59.89'luk bir engelleme yaparken, nano 4-metil kateşol % 46.00'lık bir engelleme yaptı. 4-Metil kateşol 25 µl'de % 33.89'luk bir aktivite gösterirken, nano 4-metil kateşol % 22.78'lik bir aktivite gösterdi. β-karoten bleaching antioksidan aktivite ölçümlerinde 4-metil kateşolün, nano 4-metil kateşolden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü.

İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde 4-metil kateşol 50 µl'de 0.195 abs indirgeme yaparken, nano 4-metil kateşol 0.158 abs indirgeme yaptı. 4-metil kateşol 25 µl'de 0.133 abs indirgeme yaparken, nano 4-metil kateşol 0.113 abs indirgeme yaptı. İndirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda temel boyuttaki 4-metil

kateşolün, nano boyuta getirilen 4-metil kateşolden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ölçüldü.

ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümlerinde 4-metil kateşol 50 µl'de % 84.59'luk bir aktivite gösterirken, nano 4-metil kateşol % 74.13'lük bir aktivite gösterdi. 4-metil kateşol 25 µl'de % 42.15'lik bir aktivite gösterirken, nano 4-metil kateşol % 32.20'lik bir aktivite gösterdi. ABTS radikal giderme antioksidan aktivite ölçümleri sonunda temel boyuttaki 4-metil kateşolün, nano boyuta getirilen 4-metil kateşolden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ortaya kondu.

OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümlerinde 4-metil kateşol 50 µl'de % 59.64'lik bir indirgeme yaparken, nano 4-metil kateşol % 58.45'lik bir indirgeme yaptı. 4-metil kateşol 25 µl'de % 54.64'lük bir indirgeme yaparken, nano 4-metil kateşol % 52.86'lık bir indirgeme yaptı. OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçümleri sonunda nano boyuta getirilen 4-metil kateşolün, temel boyuttaki 4-metil kateşolle yaklaşık aynı etkiye sahip olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antioksidanlar serbest radikallerin biyolojik sistemlerde oluşturdıkları oksidatif hasarları giderdikleri için büyük önem kazanmışlardır. Antioksidan bileşikler olarak polifenoller ise son yıllarda birçok çalışmanın konusu olmuşlardır. Buna karşın nano temelli antioksidanların hazırlanması veya antioksidan özelliğe sahip bileşiklerin nano boyutta hazırlanarak antioksidan özelliğinin artırılması yeni ilgi görmüş konulardandır.

T. Wu [41] vd bir antioksidan polifenol olan kuarsetini nano tüplere yükleyip antioksidan aktivitesine bakmışlardır. Kuarsetin ve kuarsetin yüklenmiş nano parçacıkların antioksidan aktivitelerini karşılaştırılması hakkında yaptıkları *in vitro* antioksidan aktivite testlerin ölçümleri sonucunda, kuarsetin yüklenmiş nano partiküllerinin antioksidan aktivitesinin temel boyuttaki kuarsetinden daha fazla aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Y. Zhang [42] vd kuarsetin ve kuarsetin yüklenmiş kitosan nano parçacıkların antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlar ve kuarsetin yüklenmiş kitosan nano partiküllerinin temel boyuttaki kuarsetinin antioksidan aktivitesinden daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Antioksidan özelliği olan Vitamin C [43] ve vitamin E [44] nano boyuta getirilmiş ve antioksidan aktivitelerinde artış olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda çeşitli polifenoller nano boyuta getirilmiş ve nano boyutta antioksidan aktivitenin arttığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmada antioksidan özelliği bilinen polifenollerden kateşol, kafeik asit, p-kumarik asit, dopamin ve 4-metil kateşol nano-precipitation tekniğini kullanarak hazırlanıldı ve *in-vitro* antioksidan aktivitelerine bakıldı.

Kateşolün molekül boyutu 657 nm'den 23.6 nm'ye düşürülüp nano boyuta getirildi. Kateşolün, temel ve nano boyuttaki antioksidan aktiviteleri, DPPH, β -karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH^- indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testleri uygulanarak karşılaştırıldı. Kateşolün; nano boyutta temel boyuta göre, DPPH antioksidan aktivite ölçümlerinde % 13.65, ABTS antioksidan aktivite ölçümlerinde ise % 12.94 daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşıldı.

Kafeik asitin molekül boyutu 727 nm'den 19.4 nm'ye düşürüp nano boyuta getirildi. Kafeik asitin, temel ve nano boyuttaki antioksidan aktivitelerine DPPH, β -karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH^- indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testleri uygulanarak karşılaştırıldı. Kafeik asitte; β -karoten bleaching antioksidan aktivite ölçüm testlerinde nano boyutta, temel boyuta göre % 7.78 daha fazla antioksidan aktivite elde edildi.

p-Kumarik asitin molekül boyutu 556 nm'den 24.8 nm'ye düşürüp nano boyuta getirildi. p-Kumarik asitin, temel ve nano boyuttaki antioksidan aktivitelerine DPPH, β -karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testleri uygulanarak karşılaştırıldı. p-Kumarik asitin; OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testlerinde nano boyutta, temel boyuta göre % 9.23 daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Dopaminin molekül boyutu 657 nm'den 23.6 nm'ye düşürüp nano boyuta getirildi. Dopaminin temel ve nano boyuttaki antioksidan aktivitelerine DPPH, β -karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testleri uygulanarak karşılaştırıldı. Dopamin; nano boyutta temel boyuta göre DPPH antioksidan aktivite ölçümlerinde % 5.23, ABTS antioksidan aktivite ölçümlerinde ise % 2.40 daha fazla antioksidan aktivite gösterdi.

4-Metil kateşolün molekül boyutu 331 nm'den 20 nm'ye düşürüp nano boyuta getirildi. 4-Metil kateşolün temel ve nano boyuttaki antioksidan aktivitelerine DPPH, β -karoten bleaching, indirgeme gücü, ABTS ve OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testleri uygulanarak karşılaştırıldı. 4-Metil kateşolün; DPPH ve OH^\cdot indirgeme gücü antioksidan aktivite ölçme testlerinde nano boyutta, temel boyutla yaklaşık aynı aktiviteyi gösterdiği sonucuna ulaşıldı.

Polifenollerini nano boyuta getirdiğimizde molekül boyutunu düşürdüğümüz ve yüzey alanını artırdığımız için çok fazla bir antioksidan aktivite beklenildi. Ölçümlerimizde en fazla % 13.65'lik antioksidan aktivite artışı görüldü. Bunun sebebi olarak kullandığımız PVA'nın maddelerimizin nano boyutta kalmasını sağlaması için etrafını sararken antioksidan aktiviteyi azaltmış olabileceği ve nano partiküllerin tekrar birleşip aglomerasyona sebep olduğunu düşünebiliriz.

Polifenollerin nano boyutta hazırlanmalarının antioksidan aktivitelerinde artışlara neden olduğu görülmüş ve söz konusu antioksidanların ilaç salınım sistemi ve benzeri konularda geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olabileceğini göstermiştir.

6.KAYNAKLAR

- [1] A.Başaran, *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*, Genişletilmiş 6. Baskı, Nobel ve Güneş Kitabevleri, 2002.
- [2] İ. Akkuş, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- [3] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1999.
- [4] B.M. Dawn, D.M.Allan, M.S. Colleen, *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1996.
- [5] R.S. Sohal, *Role of Oxidative Stress and Protein Oxidation in the Aging Process*, **Free Radical Biology and Medicine**,33: (2002) 37–44.
- [6] N. Toshima, T. Yonezawa, *Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications*, **New Journal of Chemistry**, 22: (1998) 1179–1201.
- [7] M. Öztürk, Y. Güzelhan, K. Sayar, U. Tüzün, *Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutatyon düzeylerinin araştırılması*, **Klinik Psikofarmakoloji Bülteni**, 11:3 (2001) 155-159.
- [8] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, **Journal of Agricultural Chemistry**, 52: (2004) 7970–7981.
- [9] A.A. Gönenç, Y. Orman, M. N. Şimşek, *Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients*, **Dialysis and Transplantation**, 31: (2002) 88-96.
- [10] G. Cao, R.L. Prior, *In Vivo Antioxidant Capacity: Comparison Of Different Analytical Methods*, **Free Radical Biology & Medicine**, 27: (1999) 1173-1181.
- [11] S. Turhan, N.Ş. Üstün, *Doğal Antioksidanlar ve Gıdalarda Kullanımları*, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, Mayıs 24-26, (2006) pp 273-276.
- [12] T. Ak, “*Curcumin’in Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi*” Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, 2006
- [13] M.C. Solomidou, V.R. Muzykantov, *Antioxidant Strategies In Respiratory Medicine*, **Treatment Rescue Medical**, 5: (2006) 47 – 78.
- [14] M. Cord, *Superoxide Dismutase: Rationale For Use In Reperfusion Injury And Inflammation*, **Journal Free Radical Biology Medical**, 2: (1986) 307 – 310.
- [15] S. Raha ve B.H. Robinson, *Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing*, **Trends in Biochemical Sciences**, 25: (2000) 502-507.
- [16] J.M. Mates, C.P. Gomez, *Antioxidant enzymes and human diseases*, **Clinical Biochem Castro I.**, 32: 8 (1999) 595–603.

- [17] M. Sugiyama, *Role of Cellular Antioxidants in Metal-Induced Damage*, **Cell Biology and Toxicology**, 10: (1994),1-22.
- [18] K.E. Heim, R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*, **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 13: (2002) 572-584.
- [19] H. Keskin, G. Erkmén, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci Basım, İstanbul, 1987.
- [20] I.C. Arts, P.C. Hollman, *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*, **American Journal of Clinical Nutrition**, 81:1 (2005), 317-325.
- [21] A. Escarpa, M.C. Gonzalez, *An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods*, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 31:2 (2001), 57–19.
- [22] C.G. Viguera, P. Zafrilla, F.A. Barberan, *Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins*, **Journal of the Science and Food Agriculture**, 73: (1997), 207–213.
- [23] V.D. Uzelag, K. Delonga, B. Levaj, S. Djakovic, J. Pospisil, *Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity*, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53 (2005) 4836–4842.
- [24] F. Shahidi, M. Naczk, *Food Phenolics, Sources Chemistry Effects. Application*, Technomic, USA., 1995.
- [25] G. Bilaloğlu, M. Harmandar *Flavonoidler*, Aktif Yayınevi, 1999, 382.
- [26] D.P. Makris, S. Kallthra, P. Kefalas, , *Flavonols In Grapes, Grape Products And Wines: Burden, Profile and Influential Parameters*, **Journal of Food Composition and Analysis**, (2006) 396-404.
- [27] R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, “*Polyphenolics*”, *Handbook of Food Analytical Chemistry vol. II*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2005, p. 61-535.
- [28] K.A.E. Steinmetz, J.D. Potter, *Vegetables, Fruit and Cancer Prevention: A Review*, **Journal of the American Dietetic Association**, 96: (1996) 1027–1039.
- [29] C.A. Evans, N.J. Miller, *Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids*, **Free Radical Biology & Medicine**, 20: (1996) 933-956.
- [30] E. Cadenas, L. Packer, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, Second Edition, New York, 2002.
- [31] A. Borazan, “*Öküzgözü Üzümünden Şarap Üretiminde Fermantasyon Şartlarının Antioksidan Aktivite ve Polifenoller Üzerine Etkisi*”, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2008.

- [32] M. Konuk, S. Oktay, *Biyolojik Sistemlerde Uygulamalara Yeni Bir Yaklaşım: Nanoteknoloji ve Nanomateryaller*, **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 3,(2007) 23-34.
- [33] M. Kaya, *Nano Ölçek Dünyası*, **Termodinamik**, (2005).
- [34] S. Çıracı, *Türkiye’de Nanoteknoloji*, **Bilim Teknik**, (2005).
- [35] S.I. Stupp, *Small Wonders, Endless Frontiers: A Review of the National Nanotechnology Initiative*, National, National Academy Press, Washington D.C., 2002.
- [36] <http://www.fda.gov/consumer/updates/nanotech072507.html>
- [37] J.D. Aiken, R.G. Finke, *A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis*, **Journal of Molecular Catalysis a Chemical**, 145: (1999) 1–44.
- [38] K. Mannweiler, H. Hohenberg, W. Bohn, G. Rutter, *Protein-A gold particles as markers in replica immunocytochemistry: high resolution electron microscope investigations of plasma membrane surfaces*, **Journal of Microscopy**, 126: (1982) 145–149.
- [39] M.Kajita, K. Hikosaka, M. Iitsuka, A. Kanayama, N. Toshima, Y. Miyamoto, *Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide*, **Free Radical Research**, 41: (2007) 615–626.
- [40] S.S. Ali, N. Kasoju, A. Luthra, *Indian medicinal herbs as sources of antioxidants*, **Food Research International**, 41: (2008) 1–15.
- [41] T. Wu., F. Yen, L. Lin, T. Tsai, C. Lin, T. Cham, *Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles* , **International Journal of Pharmaceutics**, 346: (2008) 160–168.
- [42] Y. Zhang, Y. Yang, K. Tang, X. Hu, G. Zou, *Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles*, **Journal of Applied Polymer Science**, 107: (2008) 891–897.
- [43] J. Yang, S. Lee, Y. Han, K. Park, J. Choy, *Efficient Transdermal Penetration and Improved Stability of L-Ascorbic Acid Encapsulated in an Inorganic Nanocapsule*, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 24: (2003).
- [44] N. Zhou, K.J. Liu, Z.C. Jian, L. Wang, Y. Yang, Q. Tian, L. Yang, *Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: A novel inspiration for development of new artificial antioxidants*, **Free Radical Biology & Medicine**, 43: (2007) 1243–1254.
- [45] J.S. Lee, G.H. Kim, H.G. Lee, *Characteristics and Antioxidant Activity of Elsholtzia splendens Extract-Loaded Nanoparticles*, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58: (2010) 3316-3321.

- [46] J. Liu, G. Chen, H. Shih, P. Kuo, *Enhanced antioxidant bioactivity of Salvia miltiorrhiza (Danshen) products prepared using nanotechnology*, **ScienceDirect Phytomedicine**, 15: (2008) 23-30.
- [47] D. Schubert, R. Dargusch, J. Raitano, S.W. Chan, *Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective*, **The Salk Institute**, (2006).
- [48] H. Wang, J. Zhang, H. Yu, *Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice*, **Free Radical Biology & Medicine**, 42: (2007) 1524–1533.
- [49] H. Wang, W. Wei, S. Zhang, Y. Shen, N. Wang, L. Yue, *Melatonin-selenium nanoparticles protects liver against immunological injury induced by bacillus Calmette-Guérin and lipopolysaccharide*, **Acta Pharmacologica Sinica**, (2005) 745–752.
- [50] E. M. Gordon, J. P. Levy, R. A. Reed, W. N. Petchpud, L. Liu, C. B. Wendler, F. L. Hall, *Targeting metastatic cancer from the inside: A new generation of targeted gene delivery vectors enables personalized cancer vaccination in situ*, **International Journal of Oncology**, 33: (2008) 665-675.
- [51] R.M.L. Schultz, V.C. Moore, A.D. Leonard, B.K. Price, *Antioxidant Single-Walled Carbon Nanotubes*, **American Chemical Society**, 131: (2009), 3934–3941.
- [52] Y.C. Chen, S.H. Yu, G.J. Tsai, D. Tang, F. Mi, Y. Peng, *Novel Technology for the Preparation of Self-Assembled Catechin/Gelatin Nanoparticles and Their Characterization*, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58: (2010) 6728-6734.
- [53] T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, L. Madler, B. Gilbert, H. Shi, *Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties*, **American Chemical Society Nano**, 2: (2008) 2121–2134.
- [54] L. Zhang, L. Laug, W. Münchgesang, E. Pippel, U. Gösele, *Reducing Stress on Cells with Apoferritin-Encapsulated Platinum Nanoparticles*, **Nano Letters**, 10: (2010) 219-223.
- [55] G.C. Yen, H. Chien, *Effects of Alkaline and Heat Treatment on Antioxidative Activity and Total Phenolics of Extracts from Hsian-Tsao (Mesona Procumbens Hemsl.)*, **Food Research International**, 33: (2000) 487-492.
- [56] A. Moure, D. Franco, J. Sineiro, H. Dominguez, M.J. Nunez, J.M. Lema, *Antioxidant Activity of Extracts from Gvuina avella and Rosa rubiginosa Defatted Seeds*, **Food Research International**, 34: (2001) 103-109.
- [57] J.Y. Hwang, *Antioxidative Activity of Roasted and Defatted Peanut Kernels*, **Food Research International**, 34:7 (2001) 639-647.

[58] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C.R. Evans, *Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay*. *Free Radic, Free Radical Biology and Medicine*, 26: (1999), 1231–1237.

[59] N. Smirnoff, Q.J. Cumbes, *Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes*, *Phytochemistry*, 28: (1989) 1057–1060.

[60] B. Ateş, L. Abraham ve N. Ercal, *Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC)*, *Free Radical Research*, 42:4 (2008) 372-377.

7.ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Malatya’da doğdu. Orta ve lise eğitimini Malatya Anadolu Lisesi ve Malatya Hacı Ahmet Akıncı Lisesi’nde tamamladı. 1997 yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazanmış ve 2001 yılında bitirmiştir. 2002 yılından beri MEB’te çalışmaktadır. 2007 yılında İnönü Fen Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans programına kayıt yaptırmıştır. Halen 2007 yılında başlamış olduğu yüksek lisans çalışmalarını sürdürmektedir.