T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI *MENTHA* TÜRLERİNİN VE TÜR İÇİ ÇEŞİTLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI, UÇUCU YAĞ ELDESİNDEN SONRA KALAN KALINTI EKSTRELERİ İLE KIYASLANMASI

ADEM ZORLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MAHFUZ ELMASTAŞ

FİTOTERAPİ ANA BİLİM DALI
FİTOTERAPİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
TEMMUZ/2024

İTHAF

“Bu çalışmayı evlatlarım Ahmet Necmi ve Sare’ye ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim ve tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimleriyle, nasıl iyi bir insan, araştırmacı ve akademisyen olunabileceği konusunda bana ışık tutan; tez sürecimin her aşamasında yol gösteren ve destek olan kıymetli danışmanım sayın Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a derin teşekkürlerimi sunarım. Onun rehberliği olmadan bu çalışmayı tamamlamak mümkün olmazdı.

Doktora sürecimde ve tez yazım çalışmam boyunca bilgi birikimini ve deneyimini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Zafer Özdemir'e.

Tez çalışmamda gerekli olan bitkisel ürünlerin temininde ve sonrasında her türlü yardımı sağlayan, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. İsa TELCİ ve Düzce Üniversitesi Öğretim Görevlisi Selma YASAK'a.

Ekstrelerin hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşım Dr. Fatih HACIMUSTAFAOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Duygu MISIRLI ve Merve SOY'a.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim, hayatı anlama, anlamlandırma ve yaşama noktasında yaşantısı ile bana örnek kılan sevgili babam Necmi ZORLU ve annem Fatma ZORLU'ya.

Bu süreç boyunca her zaman yanımda olan ve onlara ayırmam gereken vakitleri ilimle geçirdiğim dönemde desteğini esirgemeyen sevgili eşim ve meslektaşım Zeynep ZORLU'ya, çocuklarım Ahmet Necmi ve Sare'ye minnettarlığımı ifade etmek istiyorum. Sabırları, anlayışları ve destekleriyle bu çalışmayı tamamlamama imkan verdiler.

Bu tezi, sizlerin katkıları ve desteğiyle tamamlayabildim. Her birinize en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan bitki materyalleri 120 O 511 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında yetiştirilen nane çeşitleri kullanılmıştır. Proje çalışmalarının gerçekleştirildiği laboratuvar SBÜ-BAP koordiantörlüğünün altyapı projeleri ile oluşturulmuştur. Bu nedenle, hem Sağlık Bilimleri Üniversitesi hem de TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ xii
RESİMLER LİSTESİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR xiv
ÖZET xvii
ABSTRACT xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 7
2.1. LAMIACEAE AİLESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ 7
2.2. *MENTHA* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ 8
2.2.1. *Mentha x piperita* 8
2.2.2. *Mentha x dumetorum* 9
2.2.3. *Mentha arvensis* 10
2.3. *MENTHA* CİNSİNİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ 11
2.3.1. Antibakteriyel Özellikleri 11
2.3.2. Antifungal Özellikleri 12
2.3.3. Antiviral Özellikleri 13
2.3.4. Antikanser Özellikleri 13
2.4. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ 17
2.4.1. Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri 17
2.4.1.1. Maserasyon 17
2.4.2.2. Digestion 17
2.4.2.3. İnfüzyon ve perkolasyon 18
2.4.2.4. Dekoksiyon 18
2.4.2.5. Soxhlet ekstraksiyonu 18
2.4.2. Modern Ekstraksiyon Teknikleri 19
2.4.2.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu 19
2.4.2.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon 19
2.4.2.3. Ultrason destekli ekstraksiyon 20
2.4.2.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu 20
2.4.2.5. Enzim destekli ekstraksiyon 21

2.4.2.6. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu 22
2.5. UÇUCU YAĞ ELDESİ 23
2.5.1. Geleneksel Uçucu Yağ Ekstraksiyon Yöntemleri 23
2.5.1.1. Soğuk Sıkım 23
2.5.1.2. Çözücü Ekstraksiyonu 24
2.5.1.3. Enfleurage yöntemi 24
2.5.1.4. Distilasyon 24
2.5.1.5. Süperkritik gazlarla ekstraksiyon 24
2.5.2. Yeni Yeşil Ekstraksiyon Yöntemleri 25
2.5.2.1. Mikrodalga destekli ekstraksiyon 25
2.5.2.2. Kontrollü basınç düşümü süreci 25
2.5.2.3. Ultrason destekli ekstraksiyon 26
2.5.3. Uçucu Yağ Eldesinde Elde Edilen Ürünler; Uçucu Yağ, Hidrolat, Katı Kalıntı ve Atık Su 26
2.6. SEKONDER METABOLİTLER 32
2.6.1. Alkaloidler 32
2.6.2. Glikozitler 32
2.6.3. Flavonoitler 33
2.6.4. Fenolikler 33
2.6.5. Saponinler 33
2.6.6. Terpenler 34
2.6.7. *Mentha* Türlerinin Fitokimyasal Özellikleri 34
2.7. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR 35
2.7.1. Serbest Radikaller 35
2.7.1.1. Mitokondri 37
2.7.1.2. Hücresel oksidaz 37
2.7.1.3. Metal katalizli reaksiyonlar 37
2.7.1.4. Miyeloperoksidaz 38
2.7.1.5. Superoksit 38
2.7.1.6. Hidrojen peroksit 38
2.7.1.7. Hidroksil radikali (OH•) 38
2.7.1.8. Reaktif azot türleri (RNS) 38
2.7.2. Antioksidanlar 39
2.7.2.1. Süperoksit dismutaz 39
2.7.2.2. Katalaz 39
2.7.2.3. Glutatyon Sistemi 40
2.2.7.4. Glutatyon 40

2.7.2.5. Melatonin 40
2.7.2.6. Askorbik Asit 40
2.7.2.7. Ürik Asit 40
2.7.3. *Mentha* Türlerinin Antioksidan Aktiviteleri 41
3. GEREÇ VE YÖNTEM 44
3.1. BİTKİSEL MATERYAL 44
3.2. KİMYASAL MALZEMELER 48
3.2.1. Kullanılan Çözücü ve Kimyasal Maddeler 48
3.2.2. Fenolik Bileşik Standartları 49
3.3. KULLANILAN ALET VE GEREÇLER 50
3.4. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR 51
3.4.1. Ekstrelerin Hazırlanması 51
3.4.2. Ekstrelerin HPLC Analizlerinin Gerçekleştirilmesi 54
3.4.3. Antioksidan Aktivite Analizleri 54
3.4.3.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radikali giderme aktivitesi 54
3.4.3.2. 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•$^{+}$) radikali giderme aktivitesi 55
3.4.3.3. Bakır (II) (Cu^{2+}) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) 56
3.4.3.4. Demir (III) (Fe^{3+}) iyonu indirgeyici gücü antioksidan aktivitesi (FRAP) 57
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ 57
4. BULGULAR 59
4.1. EKSTRELERİN HAZILANMASINDAKİ VERİLER VE VERİM 59
4.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR 61
4.2.1. *Mentha* Türlerinden Hazırlanan Etanol/Su Ekstrelerinin Fenolik Bileşik Bulguları 62
4.2.2. Distilasyon Sonrası Nane Çeşitlerinin Katı Atık Ekstrelerinin Fenolik Bileşik Sonuçları 63
4.2.3. Distilasyon Sonrası Nane Çeşitlerinin Atık Su Ekstrelerinin Fenolik Bileşik Sonuçları 64
4.2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri ve Fenolik Bileşiklerin, *Mentha* Türlerininde ki Farklılıkların Kıyaslanması 65
4.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE BULGULARI 66
4.3.1. 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•$^{+}$) Radikali Giderme Aktivite Bulguları 66
4.3.2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) Radikali Giderme Aktivite Bulguları 69
4.3.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Gücü Antioksidan Aktivite (FRAP) Bulguları 73
4.3.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Bulguları 76

4.4. *MENTHA* VE KALINTI EKSTRELERİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERLE KORELASYONU 79
5. TARTIŞMA 81
5.1. *MENTHA* ETANOL EKSTRELERİNİN FENOLİK BİLEŞİK ANALİZLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 83
5.2. *MENTHA* ETANOL EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 89
5.3. *MENTHA* ETANOL EKSTRELERİNİN FENOLİK BILEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTALERİNİN KORELASYONUNUN İNCELENMESİ ... 94
5.4. *MENTHA* KALINTI EKSTRELERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 97
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 104
KAYNAKLAR 108
EKLER 122

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: *Mentha* türlerinin hasat tarihleri 48

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan nane çeşitleri ve ekstraksiyon için alınma miktarları 59

Tablo 4.2: Atık su ekstresine alınan su miktaları 60

Tablo 4.3: Ekstresi alınan katı kalıntı miktarları 60

Tablo 4.4: *Mentha* ekstre grupları verim yüzdeleri 61

Tablo 4.5: Sulu/etanol ekstrelerinin fenolik bileşik içerikleri 62

Tablo 4.6: Katı kalıntı ekstrelerinin fenolik bileşik içerikleri 63

Tablo 4.7: Atık su ekstrelerinin fenolik bileşik sonuçları 64

Tablo 4.8: *Mentha* türlerinin ekstraksiyon yöntemlerinin ve fenolik bileşik miktarlarının iki yönlü anova analizi 65

Tablo 4.9: *Mentha* türlerinin, ekstraksiyon yöntemlerinin ve fenolik bileşik miktarlarının tukey'in çoklu karşılaştırmalı test analizi 66

Tablo 4.10: *Mentha* türlerinin etanol/su ekstrelerininsi aktivite bulguları (A), $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme aktiviteleri 67

Tablo 4.11: Katı kalıntı etanol/su ekstrelerinin (B), $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme aktivite bulguları 68

Tablo 4.12: Atık su ekstrelerinin (S), $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme aktivite bulguları 68

Tablo 4.13: *Mentha* türlerinin etanol/su ekstrelerinin (A), DPPH• radikal giderme aktivite bulguları 70

Tablo 4.14: Katı kalıntı etanol/su ekstrelerininsi (B), DPPH• radikal giderme aktivite bulguları 71

Tablo 4.15: Atık su ekstrelerinin DPPH• radikal giderme aktivite bulguları 72

Tablo 4.16: *Mentha* çeşitlerinin etanol/su ekstresinin FRAP bulguları 74

Tablo 4.17: Katı kalıntı etanol ekstresinin FRAP bulguları 74

Tablo 4.18: Atık su ekstresinin FRAP Bulguları 75

Tablo 4.19: *Mentha* çeşitlerinin etanol ekstresinin CUPRAC bulguları 77

Tablo 4.20: Katı kalıntı etanol ekstrelerinin CUPRAC bulguları 78

Tablo 4.21: Atık su ekstrelerinin CUPRAC bulguları 78

Tablo 4.22: *Mentha* ekstre gruplarının ABTS•+, DPPH•. FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile fenolik bileşikler arasında korelasyonu tablosu……..80

Tablo 5.1: Ekstraksiyon Gruplarının Fenolik Bileşiklerinin Kayıp-Kazanç % Verimleri 98

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: *Mentha* türlerinin ve atık ürünlerinin ekstraksiyon yöntemleri 53

Şekil 4.1: *Mentha* ekstrelerinin $ABTS^{\bullet+}$ IC_{50} değerleri..... 69

Şekil 4.2: *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) DPPH• radikal giderme aktivite bulguları ... 72

Şekil 4.3: Fe^{2+} – Absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği..... 73

Şekil 4.4: *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) frap mmol Fe^{2+}/g ekstre değerleri..... 76

Şekil 4.5: Trolox absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği..... 77

Şekil 4.6: *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) CUPRAC bulguları 79

Şekil 5.1: *Mentha* Türlerinin Farklı Ekstrelerde Fenolik Bileşik Kayıp-Kazanç % Verimleri..... 99

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Bitkilerin fotoğrafları 47

Resim 3.2: Kurutulmuş ve çalışmamızda kullanılan nane çeşitleri 47

SİMGELER VE KISALTMALAR

A-549 : İnsan Akciğer Adenokarsinoma Hücre Hattı

ABTS : 2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)

ACN : Asetonitril

AKBD : Anlık Kontrollü Basınç Düşümü

BSSE : Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu

cGMP : Siklik Guanozin Monofosfat

CH_2Cl_2 : Diklormetan

CUPRAC : Bakır (II) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi

DPPH• : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EtOAc : Etil Asetat

FRAP : Demir (III) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi

GPx : Glutatyon Peroksidaz

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

HeLa : İnsan Malign Serviks Karsinomu

Hep2 : İnsan Larinks Karsinomu

HIV-1 : Human Immun Yetmezlik Virüsü – 1

HOCl : Hipoklöröz Asit

HPLC : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

HPLC-DAD : Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi-Fotodiyot Dedektörü

HPS : Hidrofilik Polifenol Standartları

HT-29 : Kolorektal Kanser Hücre Hattı IBS: Inflamatuvar Barsak Sendromu

IC_{50} : Yarı İnhibisyon Konsantrasyonu

IR : Kızılötesi Spektroskopisi

IZ : İnhibisyon Zonu

JURKAT : T Hücreli Lösemi Hücre Hattı

MAPK : Mitojen Aktive Protein Kinaz MBD: Mikrodalga Buhar Distilasyonu

MCF-7 : İnsan Meme Kanser Hücre Hattı

MDA-MB-231: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

MDE : Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

MeOH : Metanol

MFC : Minimal Fungisidal Konsantrasyon

MIAPaCa-2 : Pankreas Kanseri Araştırma Hücre Hattı

MIC : Minimum İnhibisyon Zonu

MPO : Miyeloperoksidaz

NADPH : Nikotinamid Adenin Nükleotid Fosfat

n-BuOH : n-Bütanol

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

NO : Nitrik Oksit

O^{2-} : Süperoksit Anyonu

OES : Otomatik Ekstraksiyon Sistemleri

OH• : Hidroksil Radikali

$ONOO^-$: Peroksinitrit Anyonu

PAL : Fenilalanin Amonyak Liyaz

PE : Petrol Eteri

PI3K : Fosfoinositid 3 Kinaz

RAPD : Rastgele Amplitüd Polimorfik DNA

RNS : Reaktif Azot Türleri

ROO• : Peroksil Radikali

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

SAE : Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

SKOV-3 : İnsan Over Kanser Hücre Hattı

SOD : Süperoksit Dismutaz

T24 : Mesane Kanseri Hücre Hattı

TAB : Tıbbi Aromatik Bitki

TBA : Temel Bileşen Analizi

TEAC : Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite

TPTZ : 2,4,6-tripyridyl-s-triazine

UDE : Ulstrason Destekli Ekstraksiyon

UV : Ultraviyole

UV-Vis : Ultraviyole Visible Spektroskopisi

UY : Uçucu Yağ

Vero : Yeşil Afrika Maymun Böbreği

XO : Ksilen Oksidaz

XOR : Zantin Oksidoredüktaz

BAZI *MENTHA* TÜRLERİNİN VE TÜR İÇİ ÇEŞİTLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI, UÇUCU YAĞ ELDESİNDEN SONRA KALAN KALINTI EKSTRELERİ İLE KIYASLANMASI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, *Mentha x piperita* L. türünün 9 farklı kultivarı, *Mentha x dumetorum Schult.* ve *Mentha arvensis* L.'in toprak üstü kısımlarının %70 etanol ekstresinin (A grubu), uçucu yağ eldesi sonrası *Mentha* türlerinin katı kalıntılarının %70 etanol ekstresi (B grubu) ve atık su ekstrelerinin (S grubu) fenolik içerikleri ve antioksidan aktiviteleri de araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: *Mentha* türlerinin %70 etanol ekstresi (A), Uçucu yağ eldesi sonrası *Mentha* türlerinin katı kalıntıların % 70 etanol ekstresi (B grubu) ve atık su ekstreleri (S grubu) HPLC yöntemi kullanılarak 16 farklı fenolik bileşik içeriği analiz edilmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri, DPPH• ve $ABTS^{\bullet+}$ radikalleri giderme aktiviteleri, CUPRAC ve FRAP indirgeme gücü aktivite analizleri ile değerlendirildi. Fenolik bileşikler ile korelasyon analizleri gerçekleştirildi.

Bulgular: A grubun da *Mentha x piperita* L. çeşitlerinin en yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ana bileşen eriositrin olup, rosmarinik asit ve rutin takip etmiştir. Antioksidan aktivitelerde en yüksek aktivite *M. piperita* 'Yakima' ve *M. piperita* 'Swiss' çeşitlerinde gözlemlenmiştir. Katı kalıntı ve atık su ekstrelerinin, etanol ekstresine göre fenolik bileşik kaybı tespit edilmiştir. *Mentha x piperita* 'Granada' ve *M. arvensis* L. katı atık ekstrelerinde ise artış görülmüştür.

Sonuç: *Mentha x piperita* L. çeşitlerinin fenolik bileşikleri ve antioksidan aktiviteleri tespit edilerek literatüre kazandırılmıştır. Uçucu yağ eldesi sonrası kalan kalıntı materyallerin analizleri yapılmıştır. Bunlar, fenolik bileşiklerin korunumu ve ticari potansiyelleri açısından önemli veriler sağlamaktadır. Bu atıkların eczacılık, kozmetik ve diğer sektörlerde katma değerli ürünlere dönüştürülmesi açısından önemlidir. Bu çalışmalar, *Mentha* türlerinin tam potansiyellerinin ortaya çıkarılmasını ve sürdürülebilir kullanım stratejilerinin geliştirilmesini sağlayacaktır ve gelecekte yapılacak araştırmalara önemli bir temel oluşturacaktır**.**

Anahtar Kelimeler: Antioksidan Aktivite Tayini, Distilasyon, HPLC Analizi, Katı Atık, *Mentha x piperita* L., Sıvı Atık, Uçucu Yağ

INVESTIGATION OF THE PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF SOME *MENTHA* SPECIES AND VARIETIES, COMPARISON WITH RESIDUAL EXTRACTS AFTER ESSENTIAL OIL EXTRACTION

ABSTRACT

Aim: This study analyzed the phenolic compounds and antioxidant activities of the aerial parts of 9 different cultivars of *Mentha x piperita* L., *Mentha dumetorum* Schult., and *Mentha arvensis* L. using 70% ethanol extracts (Group A). The solid (Group B) and liquid (Group S) residues of these *Mentha* species after essential oil extraction were also investigated.

Materials and Methods: The phenolic content of the 70% ethanol extracts of *Mentha* species (Group A), the solid residues' 70% ethanol extracts (Group B), and the wastewater (Group S) was analyzed using HPLC for 16 phenolic compounds. The antioxidant activities of the extracts were evaluated using DPPH• and $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging activities, and CUPRAC and FRAP assays. Correlations with phenolic compounds were assessed.

Results: The highest phenolic content was found in the *Mentha x piperita* L. cultivars, with eriositrin as the main component, followed by rosmarinik acid and rutin. *M. piperita* 'Yakima' showed the highest antioxidant activity in all test's, followed by *M. piperita* 'Swiss.' The solid and liquid waste extracts of mint species experienced varying phenolic compound loss compared to ethanol extract. *Mentha x piperita* 'Granada' and *M. arvensis* L. solid waste extracts showed gains in phenolic compounds.

Conclusion: The phenolic compounds and antioxidant activities of *Mentha x piperita* L. cultivars were identified and added to the literature. The residual materials after essential oil extraction were analyzed, providing significant data on the preservation of phenolic compounds and their commercial potential. Evaluating these residues for use in various sectors highlights their importance in producing value-added products. These studies will help reveal the full potential of *Mentha* species and develop sustainable utilization strategies, forming a foundation for future research.

Key Words: Antioxidant Activity Assay, Distillation, Essential Oil, HPLC Analysis, *Mentha x piperita* L., Solid Waste, Waste Water

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mentha, ilk olarak Jussieu (1789) tarafından tanımlanmış ve adlandırılmış olan Lamiaceae familyasının bir üyesidir (1). Bu familya kozmopolit bir dağılıma sahiptir, ılıman iklimlerden tropik bölgelere kadar birçok bölgede bulunabilir, ancak özellikle Akdeniz Havzası'nda yaygındır. Bu familyaya ait üyeler yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler, çalılar ve küçük ağaçlar olabilirler (2). Tarih boyunca, birçok nane türü çeşitli özellikler için dünyanın farklı bölgelerinde kullanılmıştır. Nane yağı, dünyanın en eski bitkisel ilaçlarından biridir. Kurutulmuş nanelerden elde edilen geleneksel ilaçların M.Ö. 1000'e uzanan zamanlarda, eski Mısır, Yunanistan ve Roma'da kullanıldığı belgelenmiştir (3).

Mentha türlerinin uçucu yağlarından elde edilen bileşenler tıbbi ve ekonomik öneme sahiptir. Uçucu yağlar tıbbi kullanım harici hava temizleyiciler, losyonlar ve diğer ürünlerin üretiminde kullanılmasından dolayı her geçen gün talep artmaktadır. En çok ticaret yapılan uçucu yağ bileşiklerinin verileri şu şekildedir mentol, menton, karvon, eugenol ve linalool'dur. Mentolün her türlü kullanımının yıllık tüketimi, ham ürün değeri yaklaşık 300 milyon doları bulmaktadır. Mentol, yılda 30.000 tonun üzerinde dünyanın en yaygın kullanılan tat ve kokulardan biridir. Mentol'ü, menton, karvon, eugenol ve linalool takip etmektedir. Bu bileşiklerin yarısından fazlasının sentetik olduğu düşünülürken, geri kalanı doğal bitki terpenlerinden elde edilmektedir. Bazı bitkisel kokulara benzeyebilen sentetik kokuların aksine, uçucu yağlar, sağlık faydalarının yeni keşiflerle doğrulanmasıyla ve bilgi artışı nedeniyle daha yüksek talep görmektedir, bu da onları kullanıcılar için daha çekici ve cazip hale getirmektedir. Bu noktada, bu uçucu yağlar kozmetik ve parfümeri sektörlerinde yeni fırsatlarla parlak bir geleceğe sahip gibi görünmektedir. Kozmetik ürünlerde geniş bir çeşitlilikte benzersiz ve hoş kokular kazandırma yetenekleri, aynı zamanda yaşlanma karşıtı, antibakteriyel, UV koruması ve beyazlatma gibi biyoaktif ajanlar olarak da kullanılmaları, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde son derece istenen bileşenler haline gelmelerini sağlamaktadır (4). Mentol, menton ve karvon bileşiklerinin büyük bir kısmı çeşitli nane türlerinden elde edilmektedir. Dünya genelinde mentol ve menton üretiminde en çok *Mentha x piperita* ve *Mentha arvensis* türleri öne çıkmaktadır. Karvon üretiminde ise *Mentha spicata* ana tür olarak dikkat çekmektedir.

Linalool üretimi genellikle lavanta uçucu yağından elde edilse de, yüksek linalool içeriği ile *Mentha x piperita* 'Granada' iyi bir alternatif olabilir (5). Dünya da ticaret hacmi en büyük uçucu yağ bileşenleri *Mentha* tür ve alttürlerinden elde edilmektedir. Bu yüzden bu bitki türü ile ilgili her yeni çalışma büyük bir önem arz etmektedir.

Mentha cinsinin taksonomisi, 1753'ten bu yana yayımlanan 3000'den fazla isimle birlikte sürekli bir değişim içinde olmuştur; bunların çoğu eşanlamlı veya çözümlenmemiş isimlerdir (4). Genellikle kültürlere atıfta bulunarak, *Mentha* L. cinsi, Güney Amerika ve Antarktika hariç tüm kıtalarda geniş bir dağılıma sahiptir. Bu cinsin çeşitlilik merkezleri, doğal ve yetiştirilen formları içeren Avrupa, Avustralya, Orta Asya ve Kuzey Afrika'dır (5).

Bitki yetiştiriciliği ve taksonomi alanlarında kullanılan çeşitli kategoriler mevcuttur. Bu kategoriler, gerekli ayrımları yapmamıza olanak tanır. Klonlar, özellikle bitki ıslahı, bitki hastalıkları araştırmaları gibi alanlarda genetik tutarlılık sağlamak için kullanılır. Klonların mı yoksa kültivarların mı kullanıldığını belirlemek bazen karmaşık olabilir, çünkü terminoloji değişebilir ve bu terimlerin kullanımı bağlama göre farklılık gösterebilir. Ancak genel olarak: Klonlar, genetik olarak aynı olan bitkilerdir. Doğal olarak oluşabilirler veya insanlar tarafından üretilebilirler. Genellikle bitkinin belirli bir bölümünden alınan ve bitkinin özelliklerini koruyan köklü kesimler veya kök ayıklama yoluyla çoğaltılırlar. Çeşitler ise Kültüre alınmış bitki çeşitleridir ve belirli özellikleri (örneğin, renk, aroma, büyüme alışkanlıkları) korur veya vurgular. Çeşitler, genellikle bitki yetiştiriciliği için seçilmiş veya ticari olarak üretilmiş çeşitlerdir (6). Nane türleri arasında en çok üretimi yapılan türlerden biri olan *Mentha x piperita*'nın yıllar içinde oluşturulmuş birçok çeşidi mevcuttur. Kültivarlarında kimyasal yapısının ve diğer fiziksel özelliklerinin araştırılması önemlidir. Çünkü bitki tür içi varyasyonlarda, üretim verimlilikleri, kimyasal içerikleri, yetişme koşulları vb. konularda büyük farklılıklar gözlemlenebilir.

Nane türleri uçucu yağlarının yanında, çeşitli ekstreleri de zengin fenolik bileşiklere sahiptir ve yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. *Mentha* türlerinin kimyasal yapısı üzerine bir çok çalışma mevcuttur ve bunlar çeşitli bileşiklere sahiptir, örneğin glikozitler, sinamik asitler, aglikonlar ve/veya asillenmiş flavonoitler (6). *Mentha* türlerinin su ekstresi fenolik asit esterleri ve flavonoit türevlerini içermektedir (7). Kafeik asit türevleri, klorojenik ve rosmarinik asit *Mentha* cinsinin başlıca fenolik

bileşikleridir (6,8,9). Ayrıca, bazı salvianolik asitler *Mentha* türlerinde bulunmaktadır (8). *Mentha* türleri flavonoit de içerir, genellikle flavonlar ve flavanonlar şeklinde. *Mentha* çeşitlerinde tanımlanan başlıca flavonlar luteolin ve türevleridir (8). Eriositrin, naringenin-7-O-glikozit, luteolin-7-O-glikozit, eriodiktiyol, izoroflolin, luteolin ve apigenin gibi diğer bazı bileşenler *Mentha* türlerinin'in su ekstresinde bulunur (6,9). Areias ve arkadaşları ayrıca *Mentha* türleri'nin su ekstresinde başlıca bir bileşen olarak glikozit eriositrini göstermiştir (9).

Çalışmamızın ilk amacı *Mentha x piperita* L. türüne ait 9 farklı çeşidin kimyasal analizlerini ve antioksidan aktivite tayinlerini gerçekleştirmektir. Buna ek olarak uçucu yağı için sıklıkla kullanılan *M. arvensis* ve bu iki türe göre daha az araştırma yapılmış olan *Mentha* × *dumetorum* bitkilerinin de ekstre analizi yapılmıştır. *Mentha x piperita* L. Çeşitlerinin ekstrelerinde fenolik bileşiklerin araştırılması üzerine yapılmış bu alanda çalışmalar kısıtlıdır. Çalışmalar daha çok bu bitkilerin uçucu yağlarının içerdikleri kimyasal bileşenler üzerine yoğunlaşmıştır. Beş farklı *M. piperita* çeşitinin uçucu yağ analizleri yapılmıştır. Sonuçlar şu şekildedir: (19)

- *M. piperita* 'Citaro': %17,3 menton, %51,8 mentol
- *M. piperita* 'Granada': %48,9 linalool, %21,2 linalyl asetat
- *M. piperita* 'Swiss': %25,8 menton, %41,5 mentol
- *M. piperita* 'Multimentha': %48,4 menton, %28,1 mentol
- *M. piperita* 'Chocolate': %18,1 menton, %51,8 mentol (19)

Başka bir çalışmada *M. arvensis* ve *M. piperita* uçucu yağları karşılaştırıldığında, *M. piperita* uçucu yağında %58,80 mentol ve %6,42 menton bulunurken, *M. arvensis* uçucu yağında %84,63 mentol ve belirgin bir menton içeriği bulunmuştur (20). Bu iki tür mentol ve menton üretimi için en çok kullanılan nane türleridir. Bu bitki türleri bu yüzden seçilmiştir.

Mentha × *dumetorum*, *M. aquatica* ve *M. longifolia*'nın bir melezidir. Önceki çalışmalarda, Karadeniz kökenli yedi örnekte uçucu yağ verimlerinin %0,2–1,5 arasında olduğu bildirilmiştir. Dört örnekte ana bileşenler olarak %18–41 menthofuran ve %8–13 1,8-sineol bulunmuştur. Bu örneklerden biri ayrıca %11 mentil asetat, %9 pulegon, %7 mentol ve %7 menton içermiştir (10).

Çalışmamızın bir diğer amacı uçucu yağ üretimi sırasında oluşan kalıntı ürünlerin analizini gerçekleştirmek ve kalıntı materyallerden elde edilecek ürünleri belirleyip katma değeri daha yüksek ürünler elde etmektir. Uçucu yağların üretimi ile bitki bioması arasındaki oran çok düşüktür, bu da önemli miktarda yan ürünlerin oluşmasına neden olur ve bu yan ürünlerin yönetilmesi gerekmektedir (11,12). 1 kg uçucu yağ eldesi için 100 kg katı atık üretildiğini tahmin edilmektedir. 2016'da sadece Fransa'da lavantaya (*Lavandula x intermedia*) ait uçucu yağın üretimi 1439 ton olarak gerçekleştiğine göre, bu, yılda 140.000 tonun üzerinde katı atık oluşturulduğu anlamına gelir (13). Aromatik bitkilerin damıtılmasından kaynaklanan yan ürünler karbon nötrdür, bu nedenle atmosferdeki karbondioksit seviyesinde ek bir artışa neden olmazlar ve döngüsel, sürdürülebilir ve ekolojik ekonominin prensipleriyle uyumlu olarak farklı kullanımlar için değerli bir malzeme olarak değerlendirilebilirler (14–16).

Uçucu yağ eldesi sonrasında katı kalıntının kimyasal bileşimi distilasyon tekniği tarafından etkilenir. Hidrodistilasyon sırasında aromatik bitkilerin kaynama işlemi sonucunda bazı bileşiklerin özellikle polar olanların atık suya sızmasıyla sonuçlanır. Bu, belirli apolar fenoller aranıyorsa bir avantaj teşkil edebilir, ancak fenoller açısından zengin fraksiyonların (yüksek toplam fenol içeriği) elde edilmesi amaçlanıyorsa dezavantaj teşkil eder. Bunun aksine, bitkinin suya batırılmadığı buhar distilasyonunda ve çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonunda kullanılan su miktarları çok düşük olduğundan bu süreç daha az önemlidir. Bu nedenle, buhar distilasyonu ve çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonunda katı kalıntıların daha önce Navarrete ve ark. tarafından gözlemlendiği gibi, belirli polariteye sahip kimyasal bileşiklerin daha yüksek konsantrasyonlara sahip olması beklenir. Kalıntı su ürünleri ise polar bileşikleri ihtiva ederler, Katı kalıntılar uçucu bileşiklerden arındırılmış oldukları için maliyet etkin deodorize edilmiş malzeme olarak kabul edilebilir (6,17)

Bu, gıda endüstrisi için avantajlıdır çünkü koku veren bileşenler ürünün organoleptik özelliklerini bozabilir veya hayvan yemlerinde tedarik edildiğinde reddetme problemlerine neden olabilir (18). Örneğin, Nieto ve ark., *R. officinalis*'in katı kalıntılarının gebelikteki koyunlarda lipit oksidasyonunu azaltmak için bir antioksidan yem takviyesi olarak kullanımının potansiyel fizibilitesini göstermiştir. Aynı doğrultuda, *R. officinalis*'in katı kalıntısı, Avrupa Komisyonu tarafından

gıdaların korunması için yarı doğal bir katkı maddesi olarak kabul edilmekte ve E-392 kodu altında düzenlenmektedir (19).

Birçok çalışma, katı kalıntıları fenolik bileşiklerin geri kazanımı için potansiyel bir kaynak olarak önermiştir (20–23) Bazı yazarlar, taze bitkilerle karşılaştırıldığında kalıntılarda daha az antioksidan aktivite gözlemlemelerine rağmen, katı kalıntıların antioksidan kaynağı olarak potansiyelini vurgulamaktadır (22,24,25). Bununla birlikte, Parejo ve ark., altı Akdeniz bitkisi ve aromatik bitkinin damıtılmış bitki materyalinde, damıtılmamış bitkilere kıyasla daha yüksek miktarda antioksidan içerdiğini bildirmiştir. Ancak, damıtma sürelerinin katı kalıntılardaki fenol varlığını önemli ölçüde etkilediği görünmektedir (26), Wollinger ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağının eldesi sonrasında katı kalıntıda, 4 saatten uzun damıtma sürelerinde rosmarinik ve karnosik asitlerde sırasıyla %75'in üzerinde ve %36'ya varan bir azalma tespit edilmiştir. Bu yazarlara göre, hidrodistilasyon süresi ne kadar uzun olursa, katı kalıntıda o kadar az fenol bulunur, özellikle de çoğu polar olanlar için (16)

Katı kalıntıların içeriğinin %75'inden fazlasının hücre duvarı polisakkaritlerinden (selüloz, hemiseelluloz ve lignin) oluştuğu belirtilmektedir (27–29). Bu nedenle, su, metanol, etanol, aseton, etil asetat dahil olmak üzere birçok çözücü ve karışımları, bu kalıntılardan fenolik bileşikleri elde etmek için sıkça kullanılır (16,25,26,30,31). Çözücü seçimi, çıkarılabilir fenollerin polaritesine bağlı olarak önemli ölçüde değişir (23) ancak toksisite, çevresel etki, bitkilerin bol olması (hem yetiştirme hem de doğal toplama) gibi diğer yönler de giderek önem kazanmaktadır ve bu nedenle su ve etanol genellikle tercih edilmektedir (30). Ayrıca, çözücülerin geri dönüşüm olasılığı da, polifenol geri kazanımının karlılığını önemli ölçüde artırır.

Çalışmamızın iki ana amacı bulunmaktadır. İlk amaç, daha önce çalışılmamış olan *Mentha x piperita* çeşitlerin fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerini inceleyerek literatüre yeni bilgiler kazandırmaktır. Bu kapsamda, çeşitli *M. piperita* kültivarlarının fenolik profilleri ve antioksidan potansiyelleri detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu analizler, literatürde eksik olan bilgileri tamamlayarak bilimsel topluluğa katkı sağlamaktadır.

İkinci amaç ise uçucu yağ eldesi sonrasında kalan katı ve sıvı kalıntı materyallerin içerik analizlerini gerçekleştirerek, bu atık ürünlerin katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülme potansiyelini araştırmaktır. Özellikle eczacılık, kozmetik ve diğer birçok sektörde kullanılabilir olan bileşenlerin belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu sayede, *Mentha* türlerinin atıklarının değerlendirilmesi ve ekonomik açıdan değerli ürünlere dönüştürülmesi sağlanacaktır. Ayrıca, bu çalışmanın bulguları, *Mentha* türlerinin ileri düzey araştırmalarına zemin hazırlayacak ve bu bitkilerin daha geniş kapsamlı çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Bu amaçlar doğrultusunda yapılacak olan araştırmalar, hem bilimsel literatüre yeni bilgiler kazandıracak hem de endüstriyel uygulamalar için önemli veriler sağlayacaktır. Böylece, *Mentha* türlerinin hem fenolik bileşikleri hem de atık materyallerinin değerlendirilmesi konularında kapsamlı bir ön çalışma gerçekleştirilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LAMIACEAE AİLESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Lamiaceae, uçucu yağlar içeren en önemli familyalardan biri olup eskiden Labiatae veya *Mentha* familyası olarak adlandırılmıştır. Bu familya, 236 cins ve 7,000'den fazla tür içeren en büyük bitki familyalarından biridir. Lamiaceae bitkilerinin aromatik özellikleri mevcuttur, parfüm, gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılmak üzere birçok Lamiaceae türü yetiştirilmektedir (32). Bu familyanın çoğu türü çalı veya otsu iken, ağaçlar son derece nadirdir (33). "Lamiaceae" kelimesi Yunanca laimos kelimesinden türetilmiş olup "çene" anlamına gelir ve bu bitkilerin çiçeklerinin küçük böcekleri kovaryuma girdikten sonra yutmalarına atıfta bulunur. Ayrıca "Labiatae" kelimesi Latince "labia" kelimesinden türetilmiş olup "dudak" anlamına gelir. Orijinal familya adı Labiatae'dir, çünkü çiçekler genellikle üst dudak ve alt dudak olarak birleşmiş taç yapraklara sahiptir (34). Bu hala kabul edilebilir bir alternatif ad olarak kabul edilsede, çoğu botanikçi artık bu familyaya "Lamiaceae" adını kullanmaktadır.

Lamiaceae'nin fitokimyası oldukça karmaşıktır çünkü birkaç grup ve alt grup bir arada bulunur ve her birinin kendi fitokimyasal özellikleri vardır. Ailenin içindeki ilk ayrım olarak Nepetoideaelar yer alır ve Nepetoidea alt familyası esas grubun parçasıdır diğer tüm alt familyalar ise ikinci olarak kabul edilir (35). Lamiaceae, 11 alt familyaya ayrılmıştır: Ajugoideae, Callicarpoideae, Cymarioideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroideae, Peronematoideae, Premnoideae, Scutellarioideae, Tectonoideae ve Viticoideae (36). Polen özelliklerine dayanarak, Erdtman (37) Lamiaceae ailesini Nepetoideae ve Lamioideae olmak üzere iki alt aileye ayırmıştır (37). Bu, Stevens ve Davis'in çalışmasını destekler (38). Nepetoideae hem morfolojik hem de moleküler kanıtlara dayanarak monofiletik bir alt aile olarak tanınmış ve desteklenmiştir (39,41).

2.2. *MENTHA* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mentha, ilk olarak Jussieu (1789) tarafından tanımlanmış ve adlandırılmış olan Lamiaceae familyasının bir üyesidir (1). Bu familya ılıman iklimlerden tropik bölgelere kadar birçok bölgede bulunabilir, ancak özellikle Akdeniz Havzası'nda yaygındır. Bu familyaya ait üyeler yıllık veya çok yıllık otsu bitkiler, çalılar ve küçük ağaçlar olabilirler (2).

Nane yağı, dünyanın en eski bitkisel ilaçlarından biridir. Kurutulmuş nanelerden elde edilen geleneksel ilaçların M.Ö. 1000'e uzanan zamanlarda, eski Mısır, Yunanistan ve Roma'da kullanıldığı belgelenmiştir. Geleneksel Çin tıbbında, yerel bir nane türü olan "bo he" olarak adlandırılan *Mentha* haplocalyx Briq uzun zamandır Çin'de kullanılmaktadır (42). *Mentha* piperita L., İngiliz botanikçi John Ray (1628–1705) tarafından tanımlanmıştır ve İngiliz nanesi (Peppermint) olarak bilinmektedir. Pappermint 1721'de Londra Farmakopesine girdikten sonra, o zamandan beri uçucu yağı için Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yetiştirilmiştir. *Mentha* cinsinin taksonomisi, 1753'ten bu yana yayımlanan 3000'den fazla isimle birlikte sürekli bir değişim içinde olmuştur; bunların çoğu eşanlamlılar veya çözümlenmemiş isimlerdir (3). Naneler farklı iklim şartlarına dayanabilir ve güneşte de yetiştirilebilirler (44). En son taksonomik işleme göre, *Mentha* cinsinin 61 türü bulunmaktadır (43).

Mentha cinsinde, *Mentha arvensis* L., *Mentha aquatica* L., *Mentha spicata* L., *Mentha longifolia* (L.) ve *Mentha suaveolens* Ehrh. gibi beş temel türün, 11 doğal melez türü tanımlanmıştır (45,46).

2.2.1. *Mentha x piperita*

M. × *piperita, M. aquatica* ve *M. spicata*'nın doğal hibritidir. *Mentha*, Yunanca Mintha'dan türetilmiştir, bu bir efsanevi bir dişi perinin ismidir ve tür adı olan piperita, biber anlamına gelen Latincedeki piper kelimesinden gelir, bu da bitkinin aromatik ve keskin tadına işaret eder (47).

M. × *piperita*, 30-90 cm'ye kadar uzanan, sapları dikdörtgensel, aromatik rizomlu çok yıllık bir bitkidir. *M.* × *piperita*, Avrupa'ya yerlidir ve doğu ve kuzey Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Afrika'nın geniş bir bölgesine yayılmıştır. Bununla birlikte, dünya çapında sürekli olarak yetiştirilmektedir (48).

M. × *piperita*, Mısırlılar tarafından yetiştirilmiş, yiyeceklerde ve çayda aroma verici olarak kullanılmıştır, kurutulmuş yaprakları Mısır piramitlerinde bulunmuştur (49). Arap bölgesinde ve Kuzey Afrika'da, Nane, "Touareg çayı" adıyla bilinen ünlü bir içecekte aroma bileşeni olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (48). İran geleneksel tıbbında, karminatif, uyarıcı, tonik, antiviral ve antifungal ajan olarak kullanılır (50). *M.* × *piperita* uçucu yağları, Batı ve Doğu geleneksel ilaçlarında, karşı spazmolitik, antiseptik, aromatik olarak ve soğuk algınlığı, mide bulantısı, boğaz ağrısı, kanser, diş ağrısı, kramp ve hazımsızlık tedavisi için kullanılır (51). Nane yaprağı ve yağı, halk tıbbında aroma verici ve kozmetik ajanlar olarak kullanılır (52). Nane çayı öksürük, bronşit, ağız mukozası ve boğazın iltihaplanmasında bir ilaç olarak kullanılır (53).

Yaprakların uçucu yağı, adet sancıları, romatizma ve kas ağrılarının hafifletilmesi için geleneksel tıp alanında kullanılır. *M.* × *piperita* yapraklarından hazırlanan infüzyon öksürük, bronşit ve iltihaplanmayı iyileştirmek için doğal bir ilaç olarak kullanılır (54). Nane yaprağı güçlü bir aromatik özelliğe sahiptir ve birçok biyolojik etki ve sağlık özelliği sergiler, ayrıca diş sağlığı ve kozmetik ürünlerde geniş kullanımını destekler (50,55).

Mentha x piperita, İngiliz Bitkisel Kompendiumunda resmi olarak listelenmiş olup, sindirim sistemi kolik, dispepsi, safra rahatsızlıkları ve şişkinlik karşıtı bir ilaç oluşturmak için kullanılır (56). Fitoterapi alanında Avrupa Bilimsel İş birliği, nane yapraklarının sindirim bozuklukları ve enteriti tedavisi için ilaç olarak kullanılmasını tercih eder (57). Nane yaprağı çayları ayrıca Alman Standart Lisansı'nda tanımlanmış ve safra kesesi ve gastrointestinal rahatsızlıklar için kullanılmaktadır. Bu ünlü bitkisel çayın klinik hazırlığında (papatya çiçekleri [%33] ve nane yaprağı [%67]) geleneksel tıpta mide rahatsızlıkları ve mide ülserlerinin tedavisinde kullanılmıştır (58). Nane yağı, çocuklarda burun tıkanıklığı ve nazal mukozanın enfeksiyonu için inhalasyonun bir bileşeni olarak kullanılır (59). Nane, Amerika Birleşik Devletleri'nde geleneksel tıpta karminatif olarak, güneş yanığı kremlerinde anti-pruritik olarak, topikal analjeziklerde kontrirritan olarak, inhalanlarda dekonjestan olarak ve gargara, sakız ve diş macunlarında antiseptik veya aroma verici madde olarak kullanılmaktadır (51).

2.2.2. *Mentha x dumetorum*

M x dumetorum, çok yıllık ve keskin kokulu bir bitki olup Türkiye'de genellikle "Kara nane" olarak bilinir ve Türkiye'ye endemiktir (60). Genellikle gıda

endüstrisinde ve halk tıbbında kullanılır. Türlerin taksonomik tanımı Davis (1982) tarafından yapılmıştır (61).

Mentha x dumetorum'un M. aquatica L. (2n = 96) ve M. longifolia L. (2n = 24 ve 48) arasında bir melez olduğuna inanılmaktadır ve bu iki tür arasında morfoloji ve kromozom sayısı açısından ara bir özellik göstermektedir. Bu türler, karşılaştırmalı amaçlarla da incelenmiştir. Schultes (1809), bu melezi tanımlayan ilk kişiydi ve onu *M. x nemorosa* Willd. (*M. x villosa* Huds.) ile *M. sylvestris* L. (*M. longifolia*) arasında ara bir tür olarak değerlendirmiştir. Bu melezin daha detaylı bir tanımı da Clapham, ve arkadaşları (1960) tarafından verilmiştir (62,63).

2.2.3. *Mentha arvensis* Linn.

*M. arvensis'*in dik gövdesinin eksenlerinde verticillasterlerde taşınır. Bu, dallı bir gövdeye sahip dik bir ottur ve 60 cm'ye kadar yükselebilir. Yapraklar basit ve karşılıklıdır, oblong-oval veya mızrak şeklinde, tabanda yoğun veya keskin dişli, tüylü veya tüysüz; gövdeler sarkık bir çiçek tozu taşır (64-66).

Mentha arvensis ayrıca Japon nanesi olarak da adlandırılır. Bu bitki Japonya orjinlidir ve Avrupa'nın diğer bölgeleri, Orta Asya ve Doğu Sibirya'da da bulunur. Bu bitkinin tüm yapısı tıbbi faydalar sunar. Bitki yaprakları hem iç pazarda hem de küresel pazarda doğal ilaçların oluşturulması için popülerdir (67).

Mentol, *Mentha arvensis* bitkisinin yapraklarından elde edilir. Doğal mentol, çeşitli vücut organlarının cildi ve mukoz zarlarını serinletici etkisi nedeniyle gıdalarda, şekerlemelerde ve sigaralarda yaygın olarak kullanılır. Doğal mentol, sentetik mentole terpenoid kirliliği nedeniyle tercih edilir (68). Yapraklardaki yağ, cildi tedavi etmek için kullanılan ve antibakteriyel, karminatif, serinletici, uyarıcı ve idrar söktürücü özelliklere sahip olan %70-80 mentol içerir. Uçucu yağlar seyreltilebilir ve sivrisinek kovucu olarak, ayrıca cilt tahrişleri, kaşıntı, yanıklar, iltihaplar, uyuz ve mantar gibi durumlar için ve hassasiyeti tedavi etmek ve ağrıyı azaltmak için kullanılır (69,70).

2.3. *MENTHA* CİNSİNİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

2.3.1. Antibakteriyel Özellikleri

Özellikle gelişmekte olan ve gelişmemiş ülkelerde, sentetik ilaçlar sadece pahalı değil, aynı zamanda bulaşıcı hastalıkların tedavisi için sınırlı miktarda bulunur ve genellikle standart gereksinimleri karşılayamazlar veya en düşük ve/veya yan etkileri gösterebilirler. Bu nedenle, mikrobiyal enfeksiyonları kontrol etmek ve mücadele etmek için yeni ve daha güvenli doğal antimikrobiyal ajanlar aramak gereklidir (71).

Mentha uçucu yağları, genellikle antimikrobiyal aktivitelerinden sorumlu olan oksijenli monoterpennoidler (mentol, menton, pulegone), monoterpen hidrokarbonlar (limonen, alfa-pinen, beta-pinen, mircen) ve seskiterpen hidrokarbonlar (beta-karyofilen, germakren D, beta bisobolol) gibi uçucu biyoaktif bileşenlerle ilişkilendirilir. *Mentha* uçucu yağlarının, *Pseudomonas aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcesens* ve *Streptococcus aureus* gibi hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteler sergilediği bulunmuştur (71,72).

Mentha piperita'nın geniş spektrumlu antibakteriyel aktivitesini bildirmişlerdir. Bu aktivite, *E. coli, Salmonella typhius, B. subtilius, S. aureus, P. aeruginosa, Staphylococcus epidermititis* ve *Klebsiella pneumonia* gibi bakteri suşlarına karşı etkilidir (73). Irshad ve ark. uçucu yağlar üzerine yaptığı çalışmaya göre, *Mentha* uçucu yağları özellikle *P. aeruginosa, E. coli ve S. enterica* gibi Gram-negatif suşlara karşı güçlü antibakteriyel etkiler sergilemiştir (74). Mahady ve ark. *Mentha piperita* metanol ekstraktının *Helicobacter pylori*'nin 25-100 µg/mL aralığında minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) ile zayıf bir şekilde etkili olduğunu bulmuştur (75).

Başka bir raporda, *Mentha spicata* yapraklarından süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile izole edilen uçucu yağların da *E. coli, S. aureus, B. aereus, B. pumilis, B. subtilis, P. aeruginosa* ve *S. poona* gibi seçilmiş bakteri suşlarına karşı iyi bir antibakteriyel potansiyele sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Test edilen yağların antibakteriyel potansiyeli, sentetik ilaçlar ve ana kimyasal bileşeni olan karvon ile

karşılaştırılabilir düzeydedir (76). Yazarlar, test edilen yağların antibakteriyel aktivitesinin, hasat bölgelerine bağlı olarak yağ bileşimine bağlı olarak değiştiğini ve ancak, bunun sentetik ilaç pozitif kontrolle görece benzer olduğunu belirttiler. Genel olarak, kurak stres altındaki nane popülasyonlarından elde edilen yağların daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, soğuk/dağlık bölgelerden elde edilenlerin ise daha yüksek antioksidan aktivite ve toplam fenolik ve flavonoit içeriğine sahip olduğunu gözlemlediler (77). Benzer şekilde, Ed-Dra ve arkadaşları *Mentha suaveolens* uçucu yağının Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisi olduğunu gösterdi (78).

2.3.2. Antifungal Özellikleri

Mantar hastalıkları dünyanın özellikle subtropikal ve tropikal bölgelerinde ciddi bir sağlık sorunudur (79). Yaygın antifungal ilaçlara karşı mikrobiyal direnç nedeniyle, yeni bitki temelli doğal antifungal ajanların keşfi ve geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır (80).

Antibakteriyel aktivitenin yanı sıra, *Mentha* türleri, patojen küfleri kontrol etmek için potansiyel bir antifungal ajan kaynağı olarak da araştırılmıştır (81) *M. spicata* uçucu yağının *Mucor mucedo, Aspergillus niger, Fusarium solani, Botryodiplodia theobromae* ve *Rhizopus solani* gibi patojen küf mantarlarına karşı iyi bir doğal antifungal ajan olduğu gösterilmiştir (82). *M. piperita* uçucu yağının antifungal aktivitesi, özellikle menton ve mentol gibi yüksek miktarda oksijenli monoterpenoidlere dayandırılabilir. *Mentha* uçucu yağlarının geniş spektrumlu antifungal aktivitesi, menton, mentol, piperitenon oksit ve karvon gibi başlıca kimyasal bileşenlerin varlığıyla ilişkilendirilebilir (83).

M. longifolia'nın uçucu yağı, *C. albicans*'a karşı 15 µg/mL konsantrasyonda antifungal aktivite gösterdi (84). *Mentha* türlerinin uçucu yağlarının başlıca bileşenlerinden biri olan mentolün, *C. albicans* hücrelerinde H^+-ATPaz pompasını ve hücre içi asitlenmeyi engellediği rapor edilmiştir (85).

Mentha x piperita uçucu yağı, *Cryptococcus neoformans*'a karşı en dikkate değer antifungal aktiviteyi (86). *Saccharomyces cerevisiae* sıkça kullanılan bir model organizma olmuştur ve farklı bileşiklerin anti-maya aktivitelerini incelemek ve etki mekanizmalarını araştırmak için kullanılmıştır (87). *S. cerevisiae* hücrelerinin *Mentha*

piperita uçucu yağı ile tedavi edilmesinin, hücre içi ROS türlerinin artışına, mitokondriyal DNA hasarlarına, mitokondriyal parçalanmalara, solunum zinciri fonksiyonunun kaybından kaynaklanan petit mutantların oluşumuna ve kromatin kondensasyonuna (hücre zarı üzerinde herhangi bir etki olmadan) neden olduğu gösterilmiştir (88). Buna karşılık, başka bir çalışmada, plazma membranın yırtılması, depolarizasyonu ve artmış geçirgenliği bildirilmiştir (89). Bu, farklı yöntemlerin farklı sonuçlara yol açabileceğini doğrulamaktadır.

2.3.3. Antiviral Özellikleri

Virüs bağımlı bulaşıcı hastalıklar, tıp biliminde bir çıkmazdır. Birçok virüs, uyum sağlayabilen yaşam tarzlarından dolayı farklı tedavilere dirençlidir ve bu nedenle uzun vadeli etkili antiviral kemoterapotik ajanların geliştirilmesi çok zor bir görevdir.

Nane uçucu yağı bileşeni mentolün, doğal bir antiviral ajan olarak hizmet etmiş olabileceğini ve *Herpes simplex*'e karşı koruma sağlamış olabileceğini öne sürürülmüştür (90). *Mentha* bitkilerinin antiviral potansiyeli söz konusu olduğunda, *Mentha spicata* uçucu yağı bazı antiviral ajanlar olarak işlev gösteren bileşikleri içerdiği bildirilmektedir (63). Uygun çalışmalar, *Mentha spicata* ekstrelerinde bulunan rosmarinik asit, luteolin ve fitol gibi fenolik bileşenlerin antimikrobiyal ve antiviral etkileri için etkili olduğunu göstermektedir (91). Yamasaki ve diğerleri, *M. piperita*'nın suda çözünebilen ekstresinin (16 µg/mL) MT-4 hücreleri deneyinde güçlü human immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1) aktivitesini sergilediğini rapor ettimişlerdir (92). Benzer şekilde, *M. longifolia'*nın metanolik ve etil asetat ekstresi insan HIV-1'e karşı önemli ölçüde inhibe edici etkiler gösterilmişdir (93). *M. piperita*'nın suda çözünebilen (poler maddeler) ekstresinin ayrıca HIV-ters transkriptazına karşı inhibe ettiği uçucu yağının da *Herpes simplex virüs tip 1* (HSV-1) karşı doğrudan virüs öldürücü aktivite gösterdiği ve plak oluşumunu etkili bir şekilde azalttığı bildirilmiştirdi (94).

2.3.4. Antikanser Özellikleri

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalımı ile karakterize edilen çok adımlı bir hastalıktır ve şu anda dünya çapında zorlayıcı bir sağlık sorunudur (95). Rapor edildiğine göre, kanser ölümlerinin %10 ila %70'i diyetle ilişkili olabilir ve insan

kanserlerinin yaklaşık üçte ikisi uygun bir yaşam tarzı seçilerek önlenebilir (96,97). Kanser, sürekli çoğalan insan vücut hücreleri ile karakterize edilen ve kontrol edilemeyen veya durdurulamayan, sonuç olarak metastatik olma potansiyeline sahip kötü huylu hücre tümörlerinin oluşumuna neden olan, tıbbi bilimlerde küresel olarak süregelen bir sağlık sorunudur. Bu kronik hastalığın tedavilerinde farklı önleyici ve iyileştirici terapilerin kullanımıyla birçok gelişme sağlanmıştır (98). Mevcut tedaviler cerrahi müdahaleler, radyoterapi ve kimyasal olarak türetilmiş ilaçları içermektedir. Kemoterapi gibi tedaviler hastaları büyük bir baskı altına alabilir ve sağlıklarına daha fazla zarar verebilir; bu nedenle kansere karşı alternatif tedaviler ve terapilere odaklanılmaktadır (99). Bitkisel ilaçlar, gelişmekte olan ülkelerde uzun yıllardır tıbbi tedavinin başlıca kaynağı olarak kullanılmaktadır (100,101). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, kanser kontrolü için nano malzeme tabanlı ilaçların hazırlanmasında karasal bitki ekstrelerinin azaltıcı ve kaplama ajanı olarak potansiyel kullanımlarını incelemeye yönlendiriliyor (102). Araştırmacılar tarafından birçok bitki türü, antikanser potansiyelleri için taranmış ve bunlardan birkaçı aynı zamanda kanser semptomlarının giderilmesi için geleneksel tıpta kullanılmaktadır (103). Bitkilerde kanser önleme ve tedavisindeki potansiyel, fitokimyasalların varlığı nedeniyle büyük ilgi görmüştür (96). Klinikte vinblastin, vincristin, vinorelbin, vindesin, estramüstin, taxol ve kolşisin gibi bazı bitki kökenli antikanser ilaçlar kullanılmış olmasına rağmen, kanserleri önlemeyi amaçlayan bitkisel besin takviyeleri ve diyetler üzerine devam eden klinik denemeler hala azdır (104,105).

Labiatae familyası, birçok araştırma *Mentha* türlerinin sitotoksisite etkisini bildirdiği için en tanınmış ve ünlü tıbbi bitkilerden bazılarını içerir. Örneğin, Rahimifard ve arkadaşları, beş *Mentha* türünün ekstreleri ve uçucu yağlarının sitotoksisite etkilerini insan malign serviks karsinomu (HeLa), insan malign serviks karsinomundan alınan ve hücre kültürlerinde kullanılan immortalize edilmiş hücre hattıdır. HeLa hücreleri, kanser araştırmaları, ilaç testleri, virüs çalışmaları ve birçok başka alanda kullanılmıştır. İnsan Larinks Karsinomu (Hep2) insan larinks (gırtlak) kanserinden alınan ve laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, kanser araştırmaları, virüs çalışmaları, ilaç testleri ve hücresel biyoloji alanlarında kullanılmaktadır. Hep2 hücreleri, özellikle kanser ve viral enfeksiyonların mekanizmalarını anlamak için önemli bir araçtır. Yeşil Afrika Maymunu Böbreği (Vero) hücre hatlarında laboratuvar araştırmalarında sıkça

kullanılan bir hücre hattıdır. Uçucu yağların, özellikle Hela hücre hattında ($IC_{50} \leq$ 42,3 µg/mL), ekstrelerden daha büyük sitotoksisite potansiyeline sahip olduğunu ve ekstrelerin Vero hücre hattına karşı ($IC_{50} \geq$ 94,3 µg/mL) daha toksik olduğunu buldular. Hep2 hücreleri diğer iki hücre hattından daha az duyarlılık gösterdi (106).

Farklı olarak, *M. spicata*'nın sulu ekstresi lösemi hücrelerinde (U937) hücreleri, insan lökemi hücre hattı olarak bilinen bir tür lösemi hücresidir. Bu hücreler, lökemik bir hastadan alınan bir tümör örneğinden izole edilmiştir. U937 hücreleri, lösemideki patolojik süreçlerin araştırılması, kanser ilaçlarının test edilmesi ve immünolojik çalışmalarda kullanılan bir model sistemidir. Bu hücre hattı, lösemiye ilişkin biyolojik mekanizmaların anlaşılmasında ve potansiyel tedavi stratejilerinin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır. (107). *M. longifolia*'nın metanol ekstresi,>0.5 µg/mL konsantrasyonda, adrenokortikal tümör hücre hatlarında antiproliferatif etkiler sergilediği ve Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK) ve PI3k/Akt (Phosphoinositide 3-Kinase) yollarında modüle edici aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (108). Ohara ve Matsuhisa, antitümör etkilere sahip 120 tıbbi bitkiyi okadaik asit (OA) tümör indükleyicisine karşı taradılar ve *Mentha* türlerinin antiproliferatif aktivitede en etkili olanlar arasında olduğunu belirttiler (%86-100) (109). Hussain ve ark. göre, *M. longifolia, M. spicata, M. arvensis* ve *M. piperit*a gibi dört yaygın olarak yetiştirilen *Mentha* türlerinden hidrodistile edilmiş uçucu yağlar, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerinde iyi sitotoksisite göstermiştir. Bu hücre hattı, birincil bir meme kanseri tümöründen izole edilmiştir ve in vitro deneylerde meme kanseriyle ilgili çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri, östrojen reseptörü pozitif olan bir hücre hattıdır, bu nedenle özellikle östrojen reseptörü pozitif meme kanseri araştırmalarında tercih edilirler. Bu hücre hattı, meme kanserinin patogenezini, metastazını ve tedaviye yanıtı anlamak için bir model sistem olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (110). Başka bir çalışma, çeşitli *Mentha* bitki ekstrelerinin antitümör aktiviteleri taranmış ve *M. pulegium*'un su ekstresinin en iyi antitümör aktivitesini gösterdiğini (94%), *M. longifolia* ekstresinin ise makul antitümör aktivitesi sergilediğini bildirilmiştir (110). Benzer şekilde, 500 µg/mL dozunda *M. longifolia*'nın metanolik ekstresi %25 hücre ölümüne neden oldu ve bu sitotoksik etki doza bağımlıydı, yani ekstre dozlarının 1000, 1500 ve 2000 µg/mL'ye kadar artırılması sırasında sırasıyla %25, %50 ve %62,5 ölüm meydana getirildiği bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, Al-Ali ve arkadaşları, *M.*

longifolia'nın su ve metanolik ekstrelerinin tuzlu karides biyotest ve Ames mutajenlik biyotestine göre belirgin antimutajenik ve antikanser aktivitelere sahip olduğunu rapor edilmiştir (111). Ayrıca, *M. pulegium*'un metanolik ekstrelerinin sitotoksik etkisinin olmadığı, ancak uçucu yağının SKOV-3, HeLa ve A549 hücre hatları üzerinde güçlü bir sitotoksik ajan olduğu gösterildiği SKOV-3 hücre hattı, insan over kanseri hücrelerinden türetilmiştir. Özellikle over kanserine yönelik araştırmalarda, özellikle de ilaç testlerinde ve kanser biyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılır. A549 hücre hattı, insan akciğer adenokarsinomundan türetilmiş bir hücre hattıdır. Akciğer kanseri araştırmalarında, özellikle ilaç testlerinde ve kanser biyolojisi çalışmalarında kullanılır. Bu hücre hatları, kanser biyolojisi ve tedavisi üzerine çalışmaların yanı sıra, hücresel ve moleküler biyolojide genel olarak kullanılan modellerdir (112). Jain ve arkadaşları, *Mentha* yapraklarının kloroform ve etil asetat ekstrelerinin HeLa, MCF-7, Jurkat, T24, HT-29, MIAPaCa-2 hücre hatları üzerinde zaman ve doza bağlı olarak önemli sitotoksisiteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu ekstrelerin ayrıca tedavi edilen hücrelerde G1 hücre döngüsü duraksaması, apoptoz, Bax ve p53 genlerinin upregülasyonu, TNF, IL-6, IFN-, IL-8 gibi bazı sitokinlerin indüksiyonu ve hücrelerde yaşlanma fenotipinin indüksiyonunu sağlamıştır. Jurkat hücreleri, T hücre lösemi hattından türetilmiş bir hücre hattıdır. Bağışıklık sistemi üzerine yapılan çalışmalarda, lösemi araştırmalarında ve hücresel sinyal iletimi çalışmalarında kullanılır. T24 hücre hattı, mesane kanseri hücrelerinden türetilmiştir. Mesane kanseri araştırmalarında, kanser biyolojisi çalışmalarında ve ilaç testlerinde kullanılır. HT-29 hücreleri, kolorektal kanser hücrelerinden türetilmiştir. Kolon kanseri araştırmalarında, kanser biyolojisi çalışmalarında ve ilaç testlerinde kullanılır. MIAPaCa-2 hücre hattı, pankreas kanseri hücrelerinden türetilmiştir. Pankreas kanseri araştırmalarında, kanser biyolojisi çalışmalarında ve ilaç testlerinde kullanılır (113). *M. pulegium*'un sulu ekstrelerini içeren gümüş nanopartiküller, MCF-7 üzerinde önemli bir sitotoksisite gösterdiği rapor edilmiştir (114). MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz 9'a bağlı hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı, insan meme kanseri hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattıdır. Özellikle invaziv ve metastatik meme kanseri araştırmalarında kullanılan bir modeldir. MDA-MB-231 hücreleri, triple negatif meme kanseri olarak bilinen bir alt tipi temsil eder. Bu hücre hattı, hücre biyolojisi çalışmaları, kanser biyolojisi araştırmaları, ilaç keşfi ve ilaç testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (115). Faridi ve arkadaşları, L-mentolün

tübülin polimerizasyonunu düzenlediğini, apoptozu indüklediğini ve ayrıca HSP90 ifadesini baskıladığını gözlemlemişler. Önerdikleri modelde, yazarlar L-mentholün doğrudan kaspaz 10 aktivasyonu aracılığıyla apoptozu tetiklediğini ve dolaylı olarak kaspaz 9'u aktive ettiğini ve bunun da kaspaz 3'ü ve mitokondriyal hücre ölümünü tetiklediğini öne sürülmüştür (116).

2.4. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Tıbbi bitkilerde yeni ilaçlar keşfetme üzerine yapılan araştırmalar, bitki ekstrelerinin yeni bileşikler için taranmasıyla başlar ve ardından biyolojik aktivite testlerinin yapılmasını içerir. Potansiyel yeni moleküller veya biyolojik olarak etkin bileşikler, daha sonra izole edilir, saflaştırılır ve moleküler yapıları belirlenir. Daha sonra, bu bileşikler farmakolojik veya toksikolojik testler için değerlendirilir (117).

Ekstraksiyon, doğal ürün araştırmalarında önemli bir özelliktir. Daha iyi verimlilik ve maliyet etkinliğine sahip daha iyi ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi ve keşfi için sürekli bir çaba vardır. Geleneksel ve modern ekstraksiyon tekniklerinin geniş bir yelpazesini, optimize edilme koşullarını ve karşılaştırmalı avantajlarını ve dezavantajlarını değerlendirmek önemlidir. Bu tekniklerin son dönemdeki çeşitli uygulamaları da eleştirel bir şekilde analiz edilmesi ekstraksiyon yöntemleri üzerine yer alan mevcut durumu ilerletmek ve yeni ekstraksiyon teknikleri keşfetmek için faydalı olacaktır (118).

2.4.1. Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri

2.4.1.1. Maserasyon: Maserasyon, bitkiden hazırlanan ham maddenin, aralıklı olarak çalkalanmak suretiyle en az üç gün boyunca oda koşullarında bir çözücüde bekletilmesini içeren basit bir ekstraksiyon yöntemidir (119).

Bu yöntemin temel dezavantajı düşük verimlilik ve uzun ekstraksiyon süresidir (119). Ancak, optimize edilmiş koşullar bu teknikle önemli bir verimlilik sağlayabilir çünkü maserasyon yöntemi kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda yüksek miktarda fenolik bileşikler ve antosiyanin elde edilmiştir (120).

2.4.2.2. Digestion: Digestion, hafif ısıtma kullanılarak gerçekleştirilen bir ekstraksiyon işlemidir ve maserasyon ile benzerdir. Ekstraksiyon sırasında istenen bitki parçaları, belirtilen sıcaklıklara önceden ısıtılmış uygun çözücü içeren bir kapta

bulunur. Optimum sıcaklık, belirli aralıklarla kapı sallanarak bir yarım saat ile 24 saat arasında değişebilen bir süre boyunca korunur (119).

2.4.2.3. İnfüzyon ve perkolasyon: İnfüzyon, bitki materyalinin kolayca çözünen bileşenlerinin seyreltik bir çözeltisi olarak tanımlanır. Bu, bitki materyalinin kaynatılmış çözücüye, özellikle suya, batırıldığı ve ardından bir süzgeç kullanılarak marc'dan (atık materyal) ayrılmış olan ekstraktın (çay) yaklaşık 15 dakika boyunca kapaklı bir kapta bekletildiği bir ekstraksiyon tekniğidir (119).

Perkolasyon, "bir sıvıyı bir katı malzemenin içinden damla damla geçirmek" anlamına gelir. Perkolasyon sırasında genellikle etil alkol gibi çözücü, bitki materyalinin içinden yavaşça geçirilir, giderek fitokimyasallarla dolarken, üstten eklenen taze bir çözücü tarafından yavaşça aşağıya doğru ilerletilir (119,121)

Ekstraksiyon çözücüsünün seçimi, çıkarılan ikincil metabolitlerin kimyasal özelliklerine bağlıdır. Su-alkol çözücü karışımı yaygın olarak kullanılmakta olup, su bitki hücre duvarlarını hidratlarken alkol, bitki materyalinden çıkarılan çoğu aktif bileşiklere kimyasal olarak benzerdir (122,123).

2.4.2.4. Dekoksiyon: Bu ekstraksiyon tekniği, artan sıcaklıkla bozulmayan veya değişmeyen fitokimyasallar için kullanışlıdır. Dekoksiyon sırasında bitki materyali su içinde 15 ila 60 dakika kaynatılır (119). Kaynatma süresi, bitki dokularının ve çıkarılan fitokimyasalların özelliğine bağlı olarak değişir. Genellikle, yapraklar, kökler, çiçekler ve yumuşak saplar gibi hassas bitki parçaları 15 dakika boyunca kaynatılır. Örneğin, fenoller ve flavonoitler, meyveler, rizomlar ve yapraklardan 100 °C'de dekoksiyon ve infüzyon kullanılarak çıkarılmıştır (124).

2.4.2.5. Soxhlet ekstraksiyonu: Soxhlet ekstraksiyonu, sıcak bir çözücü kullanılarak fitokimyasalların sürekli olarak ekstraksiyonudur. Öğütülmüş bitki materyali, ya sert bir filtre kağıdından ya da selülozdan yapılmış bir gözenekli torba içine yerleştirilir (119). Silindirik kap içine yerleştirilen öğütülmüş bitki materyali, Soxhlet aparatının bölmesine yerleştirilir. Alt balon içine etanol veya metanol gibi ekstraksiyon çözücüsü yerleştirilir. Çözücü daha sonra ısıtılır ve buharlaşır, örnek torbasında yoğunlaşır, ardından da cihazın üstündeki kondenserde yoğuşur ve ekstraksiyonu sağlamak için geri damlar. Bu yöntemle, maserasyon tabanlı

ekstraksiyon tekniklerine kıyasla artırılmış verim elde edilir. Bu teknik kullanılarak, kenevir tohumlarından 70 °C'de sekiz saat süreyle ve yapraklardan fenolik bileşikler ve yağ asitleri elde edilmiş ve içerdiği kimyasal bileşikler araştırılmıştır (125,126).

2.4.2. Modern Ekstraksiyon Teknikleri

2.4.2.1. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu: Bu teknik, düşük çözücü talebi, yüksek verim ve nispeten daha az zaman tüketimi gibi faydaları nedeniyle önemli bir öneme sahiptir. Otomatik Ekstraksiyon Sistemi (OES) işlemlerinin uygun koşulu, daha yüksek çözücü sıcaklığı ve basıncını içerir. Bu teknik hem maserasyon hem de soxhlet ekstraksiyonundan daha etkin bir çözücü ekstraksiyon tekniğidir. Önemli OES performansını destekleyen örnekler mevcuttur. Örneğin, ahududu posasından lipofilik ve hidrofilik fitokimyasalların elde edilmesinde OES'nin, süperkritik akışkan ekstraksiyonu'na (SAE) kıyasla daha iyi performans gösterdiği bulunmuştur. OES'de sıcaklık ve ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkileri önemli ölçüde daha azdır, ancak SAE'deki %15'lik verime kıyasla %25 lipofilik ve hidrofilik bileşikler elde edilmiştir (127).

2.4.2.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon: Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), mikrodalgaları ve çözücüleri ekstraksiyon sürecinde kullanan doğal ürünlerin ekstrelerin çıkarılmasının son dönemdeki yenilikçi bir yoludur. Mikrodalga frekansı 300 MHz ile 300 GHz arasında değişmektedir. Ekstraksiyon sürecinde, mikrodalgalar çözücüyü ve bitki dokusunu ısıtarak ekstraksiyonun kinetiğini artırır. Mikrodalgalar, özellikle polar moleküllere doğrudan etki ederek örnekleri ısıtır. Mikrodalga enerjisinin ısıya dönüşümü dipolar rotasyonları içerir. Isınma, çözücülerin dielektrik sabitine doğrudan bağlıdır (128). Çözücünün viskozitesi ekstraksiyon sürecini önemli ölçüde etkiler çünkü daha düşük viskozite iyonların dağılmasını kolaylaştırır ve dolayısıyla çözünme sağlar (129,130). MDE tekniği kullanılarak tohumlardan saponinler, yapraklardan polifenolik antioksidanlar, kurutulmuş mantarlardan steroller ve yapraklardan flavonoidler gibi çeşitli fitokimyasallar elde edilmiştir (131,132).

Ayrıca, etanol veya su gibi polar çözücülerin yüksek dielektrik sabitine sahip olması, çözücü ve numune karışımının ısınmasını teşvik edebilir. Dolayısıyla, termolabilite ihtiyaç duyan ve nispeten daha düşük sıcaklıklara gereksinim duyan

örneklerin ekstraksiyonunda daha düşük dielektrik sabitine sahip çözücülerin kullanılması tavsiye edilir. Bitki materyali, termolabiliteyi korumak için mikrodalga geçirgen çözücü olan n-hekzan gibi bir çözücü içinde batırılır (133). MDE, kullanıcı dostu ve çok yönlü bir tekniktir; hatta uçucu bileşikler bile kısaltılmış zaman dilimlerinde ekstrakte edilmiştir. (134).

2.4.2.3. Ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) (ses dalgası ekstraksiyonu): Ultrasonik dalgalar, insan kulağının duyabildiği ses dalgalarından daha yüksek frekanslara sahip elektromanyetik dalgalardır. Kullanılan ultrasonik dalgaların frekansı genellikle 20 kHz ile 2000 kHz arasındadır (135). İlginç bir şekilde, yapılan bir çalışma da 120 kHz'ye kıyasla 40 kHz'de daha yüksek miktarda fenol bileşiği elde edildiğini gözlemlenmiştir (136).

Bir UDE çalışması, çözücü içeren bir durumla karşılaştırıldığında, %75,3'lük etil alkol ile 40 dakika süren çıkarma sürecinden daha yüksek verim elde edilmiştir (137). Ultrasonik dalgaların mekanik etkisi, çözücü moleküller ile bitki örneği matrisi arasındaki yüzey temasını arttırır. Böylece, ultrasonik dalgalar bitki materyalinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirir ve bozar, fitokimyasalların salınımını hızlandırır ve çözücü sistemin bitki hücrelerine kütlesel hareketini daha da güçlendirir (138,139).

Vurgulanması gereken bir başka önemli özellik, UDE'nin yüksek sıcaklıklarda bozunan bileşiklerin doğasının korumasıdır. Örneğin, karotenoidler, fenolikler ve C vitamini gibi bileşikler, zencefil, sarımsak ve zerdeçal gibi baharatlardan kimyasal yapılarıyla bozunmadan çıkarılmıştır (140). Ayrıca, UDE diğer ekstraksiyon teknikleri ile birlikte kullanılarak ekstraksiyon süresini kısaltmak için kullanılmıştır (119).

2.4.2.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu: SAE teknolojisi ticari ölçekte çeşitli kaynaklardan değerli bileşiklerin çıkarılmasında geniş bir uygulamaya sahiptir. Bu teknik, gıda ürünlerinden değerli bileşiklerin çıkarılması için büyük potansiyele sahiptir. SAE, gazın sıvıya dönüşmesi için gereken sıcaklık ve basınç değişiklikleriyle tanımlanabilir, burada iki faz ayırt edilemez. Bir üstkritik akışkan maddenin, kritik noktasında hem gaz hem de sıvı fazların fiziksel özelliklerini paylaşır (141,142).

Tohumlardan alkaloitlerin çıkarıldığı basınç değeri 27 MPa'dır (143). Tatlı kiraz yapraklarından polifenoller, vitaminler, antosiyaninler, diyet fenolik bileşikler ve karotenoidlerin çıkarıldığı basınç değeri 30 MPa'dır (144). Bir bitkiden uçucu yağların çıkarıldığı basınç değeri 30,4 MPa'dır (145). Patates kabuklarından fenolik bileşiklerin çıkarıldığı basınç değeri 350 bar'dır (146).

Üstkritik CO_2 ($scCO_2$) kullanımı, polar olmayan fitokimyasallar için güçlü çözücü özelliğinden dolayı ekstraksiyonu artırır. Ancak, polarize fitokimyasallar üstkritik CO_2 içinde düşük çözünürlüğe sahip olma eğilimindedir. Polar fitokimyasalların üstkritik CO_2 içindeki çözünürlüğü, az miktarda etil alkol veya metanol, su, aseton, etil asetat, asetonitril gibi çözücülerin eklenmesiyle artırılabilir. (147). Dahası, etanol ko-çözücü, fenolik bileşikler ve flavonoitlerin artırılmış verimle geri kazanılmasını sağladı ve artan bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu rapor edilmiştir (148).

Üst kritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi, doğal kaynaklardan ticari ekstraksiyonlara uygulanır. Ancak, sıcaklık ve basınç parametrelerinin ayarlanması, verimi artırmak ve biyolojik aktiviteleri ödün vermeden sürdürmek için kritiktir (149). Daha yüksek sıcaklık, çözücülerin üstkritik CO_2 içinde çözünürlüğünü artırır, ancak termolabil moleküllerin durumunda sıcaklık etkisi göz önünde bulundurulmalıdır (150). Termolabil fitokimyasalların durumunda, sıcaklığı değiştirilmemiş düşük değerlerde tutarken basıncı artırmak, fitokimyasalların bozulmasını engellemeye yardımcı olur. Örneğin, sıcaklık, karbondioksit akış hızı ve ekstraksiyon süresini sabit tutarak, domates kabuğundan termolabil fitokimyasalların önemli bir verimi yüksek basınçta çıkarıldığı görülmüştür (151). Maksimum verim elde etmek ve ürün kalitesini korumak için, ekstraksiyon işleminden önce hiçbir nem izi bulunmayan uygun bir örnek hazırlığı çok önemlidir, çünkü nem bu ekstraksiyon sürecinde verimi olumsuz etkileyebilir (152).

2.4.2.5. Enzim destekli ekstraksiyon: Bazı bitkilerde, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi van der Waals kuvvetleri tarafından stabilize edilen polisakkarit lignin ağından fitokimyasalların ayrılması zor olabilir. Bu matrislerdeki fitokimyasallar hücre sitoplazmasında dağılır ve çözücü ekstraksiyon işlemi ile ulaşılamazlar. Bu tür örneklerde bağlı fitokimyasallar, bitki materyalinin belirli

enzimlerle ön işlem görerek yüksek verimlerde etkili bir şekilde serbest bırakılır. Bu enzimler arasında selülaz, hemisellülaz, pektinaz, amilaz, proteaz, glukozidaz, lipazlar, arabinaz bulunur. Hücresel duvarları parçalayarak fitokimyasal verimi artırmak için ekstraksiyon sırasında eklenir. Ayrıca, bu enzimler selüloz ve lipit cisimleri gibi karbohidratları hidrolize ederler (153).

EDE, enzimler çözücüye ulaşamayan ve dolayısıyla ekstraksiyon için savunmasız hale getirilen çıkarılamayan fitokimyasalları erişilebilir hale getirdiği için diğer ekstraksiyon teknikleri ile birlikte kullanılır. Örneğin, enzimlerin mikrodalga işlem sırasında kullanımı, su kullanılarak yapılan geleneksel çözücü ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, daha yüksek ekstraksiyon sıcaklığında ve daha hızlı ısıtma stratejisiyle zeytin posasından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunun artırılmasına neden olmuştur. Bu yöntem düşük fitokimyasal verim elde edildiği bildirilmiştir (154,55).

Enzim destekli ekstraksiyon tekniğini kullanırken dikkate alınması gereken birçok parametre bulunmaktadır. Örneğin, yeşil yerba mate'den (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) enzim destekli ekstraksiyon kullanılarak, yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak polifenoller çıkarılmış ve en uygun ekstraksiyon koşullarını belirlemek için çalışılmıştır. Sıcaklık, enzim konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve pH bağımsız değişkenlerdir (156).

2.4.2.6. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu: Bu teknik, artırılmış basınçta sıcak su çözücüsü kullanır. Çevre dostu bir teknik olması ve önemli verimler sağlaması nedeniyle, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine olası bir alternatif olarak önemli dikkat çekmiştir (157). Bu teknik kullanılarak avoparsin, antioksidanlar, fenolikler ve saponinler gibi birçok bileşik sınıfı ekstrakte edilmiştir (157).

BSSE'nin kullanım kriterleri, suyun atmosferik kaynama noktası olan 100 °C, 0.1 MPa'nın üzerinde ama kritik eşiğinin altında 374 °C, 22.1 MPa olduğu durumlardır; bu durumda su, polar olmayan bir formda, polar olmayan fitokimyasalları çözer. Dolayısıyla, BSSE'de su, hem polar hem de polar olmayan fitokimyasallar için evrensel bir çözücü olarak işlev görür. (158,159).

Diğer çözücülerle karşılaştırıldığında, BSSE'deki suyun fitokimyasalları kurtarmada üstün olduğu bulunmuştur. Örneğin, fitokimyasalların geri kazanımı sırasında suyun "yeşil çözücü" olarak kullanılmasıyla, BSSE, galotanin ve flavonol verimlerinin, sulu metanol bazlı ekstraksiyon kullanılarak elde edilenlerden önemli ölçüde daha yüksek olduğu örneklerin geri kazanılmasını sağladı (160). Ancak, 170 °C'nin üzerindeki sıcaklıklar kurtarılan fitokimyasalları bozmuştur. Doğal derin eutektik çözücüler, subkritik akışkan ekstraksiyonun verimliliğini artıran iyi yardımcı çözücülerdir. Doğal derin eutektik çözücüler kullanılarak, subkritik su ekstraksiyonunun, optimum 100 °C sıcaklığında, üzüm posasından fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimini artırdığı gözlemlenmiştir (161).

2.5. UÇUCU YAĞ ELDESİ

Antik çağlardan beri birçok bitki türünün uçucu kimyasal bileşikler içerdiği ve uygun bir lipid çözücü kullanılarak "uçucu yağlar" olarak çıkarılabileceği bilinmektedir. Uçucu yağlar, bir bitkinin bileşiminin küçük bir kısmını temsil eder ancak aromatik bitkilerin farmasötik, gıda ve parfüm endüstrilerinde kullanıldığı karakteristik özellikleri sağlar. Günümüzde, uçucu yağların karmaşık ve değişken bir bileşime sahip olduğu, özellikle hidrokarbonlar ve oksijenli bileşikler gibi birçok bileşenden oluştuğu açıktır. Kokuları, bu bileşiklerin her birinin kokusunun birleşiminden kaynaklanır. İz bileşenler de önemlidir çünkü yağa karakteristik doğal bir koku verirler. Bu nedenle, bitkilerden uçucu yağların herhangi bir teknoloji ile çıkarılması sırasında bileşenlerin doğal oranının korunmasının önemlidir. Bu yağların çeşitli bitki materyallerinden ayrılması için farklı yöntemler kullanılır. Bu yağların izole edilmesinin nispeten basit görünmesine rağmen, yağın bileşimi kullanılan ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir (162).

2.5.1. Geleneksel Uçucu Yağ Ekstraksiyon Yöntemleri

2.5.1.1. Soğuk sıkım: Ekspresyon veya soğuk sıkım, en eski ekstraksiyon yöntemidir ve neredeyse yalnızca narenciye uçucu yağlarının üretimi için kullanılır. Bu yöntem, kabuk ve kutiküllerdeki uçucu yağ bezlerinin kırılmasıyla yağın serbest bırakılmasını sağlayan herhangi bir fiziksel işlemi ifade eder. Bu süreç, su bazlı bir emülsiyonun üretilmesine neden olur ve daha sonra uçucu yağın ayrılması için santrifüjlenir (163).

2.5.1.2. Çözücü ekstraksiyonu: Çözücü ekstraksiyon, termal olarak labil olan uçucu yağların (örneğin, çiçeklerden elde edilenlerin) çıkarılması için kullanılabilir. Bu yöntemde, bitkisel materyal bir çözücü banyosuna yerleştirilir ve çözülür. Ekstraksiyon işleminden sonra, uçucu yağı (diğer bileşiklerle birlikte) içeren sıvı karışım bir filtrasyon işleminden geçirilir ve ardından damıtma işlemine tabi tutulur. Genellikle ekstraksiyon için kullanılan çözücüler alkol, heksan, etanol, petrol eteri ve metanoldür. Bu yöntem parfüm endüstrisi tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (163).

2.5.1.3. Enfleurage yöntemi: "Enfüzyon", antik çağlara dayanan başka bir geleneksel ekstraksiyon yöntemidir. Başlıca çiçeklerden (örneğin, yasemin) uçucu yağların çıkarılması için kullanılmıştır. Bu yöntemde, saf kokusuz soğuk yağ bitki materyaline (örneğin, çiçeklere) yayılır. Kokular çiçeklerden çıkar ve sonuç olarak yağda çözünürler. Yeni çiçekler eski olanların yerini alır ve yağın doygunluğuna ulaşılana kadar süreç çok uzun süreler boyunca tekrarlanır. Daha sonra yağ toplanır ve alkol ile ekstrakte edilir. Günümüz standartlarına göre, zaman alıcı, işgücü yoğun ve maliyetli bir yöntemdir. Gıda endüstrisinde kullanılan uçucu yağlar için herhangi bir uygulaması bulunmamaktadır ve günümüzde neredeyse kullanılmamaktadır (163).

2.5.1.4. Distilasyon: En yaygın kullanılan ekstraksiyon yöntemi, buhar distilasyonu veya su distilasyonu yöntemidir. Bu ekstraksiyon süreci 1 ile 10 saat arasında sürebilir. Üretilen yağ miktarı, distilasyon süresinin uzunluğuna, sıcaklığa, basınca ve bitki materyalinin türüne bağlıdır (164). Distilasyon sırasında, bitki materyalleri buharlaşma yoluyla içlerindeki uçucu yağı serbest bırakmak için kaynar suya veya buhara maruz kalır. Buharlaşma sırasında oluşan buhar ve uçucu yağ buharları yoğuşturulduğunda, genellikle “Florentine ampulleri” olarak adlandırılan bir kapta toplanır ve ayrılır (165).

2.5.1.5. Süperkritik gazlarla ekstraksiyon: Kullanılan akışkanın çözücü gücü (yani, çözücü ile çözünen arasındaki etkileşim) basınç ve/veya sıcaklık değiştirilerek kontrol edilebilir, bu da çok yüksek seçiciliğe yol açar. Ancak, yüksek basınçtan kaçınılmalıdır çünkü bu istenmeyen yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin çıkarılmasına yol açabilir (örneğin, uçucu yağ izolasyonu sırasında parafinlerin eş zamanlı çıkarılması).

Superkritik akışkan ekstraksiyonunun konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması/faktörlerin ekstraksiyon koşullarını etkilemesi: Başarılı bir SAE için birkaç faktör dikkate alınmalıdır. Bu faktörler örneğin numunenin türü, numune hazırlığı, akışkanın türü, modifiye edicilerin seçimi, akışkan besleme yöntemi ve ekstraksiyon koşulları arasında basınç, sıcaklık, akış hızı ve ekstraksiyon süresi yer alır (166.) Uygulamada, SAE genellikle düşük kritik sıcaklığı, düşük maliyeti, toksik olmaması, kokusuz ve tatsız olması, kalıntı bırakmadan kolayca uzaklaştırılabilmesi gibi özellikleri nedeniyle CO_2 kullanılarak gerçekleştirilir. Ayrıca, CO_2, çoğu polar olmayan ve bazı polar moleküller için iyi çözücü özelliklere sahiptir (167). İşlem koşullarını (örneğin, CO_2'nin sıcaklığı ve basıncı) değiştirerek, istenilen bileşimde bir yağ seçiciliğiyle çıkarılabilir (168).

2.5.2. Yeni Yeşil Ekstraksiyon Yöntemleri

2.5.2.1. Mikrodalga destekli ekstraksiyon: Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), özgün ısıtma mekanizması (sürtünmeye dayalı), uygun maliyeti ve atmosferik koşullar altında iyi performansı nedeniyle özellikle dikkat çeken ek bir teknolojidir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle (örneğin, Soxhlet ekstraksiyonu) karşılaştırıldığında, MDE daha yüksek ekstraksiyon verimleri, daha kısa ekstraksiyon süreleri ve daha yüksek seçicilik sağlar (169). Ayrıca, MDE, basitlik ve işletme maliyeti açısından SAE'ye üstün olarak da düşünülebilir (170). Ancak, genellikle daha fazla organik çözücü miktarı gerektirir, bu da SAE'ye göre çevre dostu olmamasına neden olur (171). Mikrodalga ısıtmadan faydalanma girişimiyle, araştırmacılar mikrodalga ile geleneksel yöntemleri birleştirerek, mikrodalga destekli çözücü ekstraksiyon, vakumlu mikrodalga hidrodistilasyon, mikrodalga hidrodistilasyonu, sıkıştırılmış hava mikrodalga distilasyonu ve mikrodalga destekli buhar distilasyonu gibi yeni yöntemler geliştirdiler (172).

2.5.2.2. Kontrollü basınç düşümü süreci: Bu yöntem başlangıçta çeşitli ürünlerin dokusunu ve kurutulmasını sağlamak için kullanılmış ve daha sonra yüksek kaliteli uçucu yağların çıkarılması için bir ölçüt yöntemi olarak genişletilmiştir. Bu, ürünün yüksek buhar basıncından vakuma hızlı bir geçişe maruz bırakılarak oluşturulan termomekanik işlem temel alınarak gerçekleştirilir. Anlık kontrollü basınç

düşümü (AKBD) ile işleme, bitkideki sıvının genel difüzyonunu artırır ve çözücü kullanımını gerektirmez (173).

2.5.2.3. Ultrason destekli ekstraksiyon: Gıda işleme teknolojisinde ultrason destekli ekstraksiyon (UDE), bileşen ekstraksiyonunu (örneğin, yağlar, proteinler, polisakkaritler) kolaylaştırabilmesi nedeniyle ilgi çekicidir. Ultrason uygulamasının başlıca avantajları, çıkarılabilir bileşenler üzerinde minimum etkilere sahip olması, organik çözücülerin azaltılması/önlenmesi (genelde güvenli olarak kabul edilen çözücülerle de etkilidir) ve ekstraksiyon süresinin azaltılmasıdır (174). Ultrasonik etkiler, kavitasyon fenomenine dayanır, yani mikroskobik kabarcıkların oluşumu ve parçalanması. Kabarcıklar boyut olarak büyüdükçe, şiddetli bir şekilde çökerler. Bu şiddetli çöküş, hücre zarı hasarına neden olan mekanik kuvvetlere yol açar bu da çıkarılan malzemelerin yüksek verimlilikte ve hızlı bir şekilde çıkarılmasına yol açar. UDE'nin avantajlarını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (175). Kimyon tohumlarının ultrason ile işlenmesi ve ardından hidrodistilasyon uygulanması, işlenmiş ve işlenmemiş örnekler için sırasıyla daha kısa sürede (30 ve 90 dakika) daha yüksek uçucu yağ verimi elde edilmesini sağladı ve yağın bileşimini etkilemedi. Ultrason ön işlemi, daha yeni ekstraksiyon teknikleri ile birleştirilerek çok umut verici sonuçlar verdi. Bademlerden yağın süperkritik akışkan ekstraksiyonu, ultrason ile işlenmiş bademlerle uygulandığında, yağ verimini arttırdı ve işleme süresini süperkritik akışkan ekstraksiyonuyla karşılaştırıldığında yaklaşık %30 azalttı (176).

2.5.3. Uçucu Yağ Eldesinde Elde Edilen Ürünler; Uçucu Yağ, Hidrolat, Katı Kalıntı ve Atık Su

Birçok aromatik bitkiden elde edilen uçucu yağlar genellikle buhar distilasyonu ile çıkarılır ve her bitki türü genellikle distilasyon sürecinin belirli bir sıcaklık ve süresine sahiptir (177). Herhangi bir aromatik bitkinin buhar distilasyonu dört ürün ortaya çıkarır: Uçucu yağ, buhar distilasyonu ile elde edilen katı kalıntı bitki materyali, atık su ve hidrolat. Uçucu yağ hedeflenen değerli üründür, ancak katı kalıntı bitki materyali, bitki türüne bağlı olarak hayvan yemi olarak kullanılabilir. Artık su, buharlaştırılan sıcak buharın bitki materyali üzerinden geçişi sırasında kısmen kondensasyon sonucu buhar distilasyonu yapılmış biyokütlenin altında birikir. Hidrolat, uçucu yağdan ayrıldıktan sonra distilasyon cihazından elde edilen sudur. Hidrolat genellikle kaçan herhangi bir artık uçucu yağın ayrılması için yeniden

damıtılır ve çevreye salınan tek atık ürün, artık distilasyon suyudur. Esasen, artık distilasyon suyu, uçucu yağ içermeyen sıcak buhar/sıcak su bitki ekstresidir (178).

Son literatürde, tıbbi ve aromatik bitkiler (TAB) geleneksel tıbbi ve aromatik bitkilerin distilasyon atıklarından fenolik bileşiklerin geri kazanılmasıyla ilgili metodolojilere odaklanan derlemeler mevcuttur (179). Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen artık biyokütlenin kullanım olanaklarına odaklanan çalışmalar mevcuttur (180).

Uçucu yağ endüstrisinin başlıca ve yüksek katma değerli ürünü olan uçucu yağlar, kullanılan bitki materyalinin sadece küçük bir kısmını oluşturur ve genellikle %5'in altındadır, bu da önemli miktarda biyokütle oluşturur ve görünürde herhangi bir ticari kullanımı yoktur (181). Uçucu yağların geri kazanılmasından sonra kalan katı kalıntılar (KK), Atık Su (AS) ve hidrolat olarak sınıflandırılabilir. Hidrolat, distilasyonun sulu yan ürünüdür ve UY'ların ve bitki materyalinin suyla çözünebilen bileşenlerinin kolloidal dağılımlarını içerir (179). Her ikisi de ya atılması ya da değerlendirilmesiyle ilgili çevresel sorunlara neden olur ve UY işleme endüstrisinde ele alınması zorluklar oluşturur. Bu biyokütlelerin biyoaktif bileşiklerin bir kaynağı olarak potansiyel kullanımı, böyle bir çevresel etkinin yönetilmesi için ilginç bir alternatif sunar. Yapılan çalışmalarda, bu AS'lar antioksidan, metal şelatlayıcı ve antimikrobiyal özelliklere sahip fenolik bileşikler açısından zengindir (181,182).

TAB'ların distilasyonu sonrasında kalan AS'lar genellikle mikrobiyal büyümeyi önlemek ve uzun süreli depolama süresince kararlılığı sağlamak amacıyla kurutulur, böylece işlenmiş AS'ın daha iyi kalitesi sağlanır. Farklı kurutma protokolleri literatürde rapor edilmiştir. Seçim, kurtarılmak istenen aktif maddelerin yapısına, distile edilen bitkisel malzemeye, mevcut ekipmana ve enerji ile ilgili maliyetlere bağlıdır. Güneşte veya gölgede hava kurutması genellikle oldukça düşük maliyetli geleneksel bir yöntem olarak kabul edilir ve bu nedenle AS işlemi için sıkça kullanılır. Ancak, istenen bileşenlerin önemli kayıplarına neden olabilecek uzun süreli maruz kalma gerektirir, 24 saat ile birkaç güne kadar değişebilir (183-185). Ayrıca, güneş veya gölge kurutma koşulları hava koşullarına bağlı olduğundan, kurutulmuş AS'ın değişken özelliklere sahip olmasına neden olur (186). Vasileva ve ark. tarafından yapılan ilgili bir çalışmada, adaçayı, kekik ve lavanta AS'ların 35 °C'de gölgede kurutulmuştur. AS'ın kurutulması için fırın kurutma, kızılötesi kurutma,

mikrodalga kurutma, vakum kurutma, dondurarak kurutma vb. gibi ekipmanların kullanımı, verimliliği artırmak ve ürün kalitesini korumak için etkili alternatiflerdir. Genel olarak, düşük sıcaklıklarda (32-40 °C) uzun süreler (24-48 saat) boyunca konvansiyonel fırınlarda kurutma, UY'ların tükenmiş biyokütlesi için sıkça kullanılan bir yöntemdir, ancak uzun işleme süresi ve enerji maliyetleri ile ilgili dezavantajları vardır. Literatürde, çok daha yüksek sıcaklıkların ve daha uzun sürelerin (70 °C'de 72 saat) uygulanmasına dair raporlar vardır. Alternatif fırınlar kullanılarak vakum altında daha yüksek sıcaklıklarda (50 °C) kurutma, geleneksel fırınlarda kurutmaya göre daha kısa kuruma sürelerine neden olabilir (187,188). Öte yandan, mikrodalga veya kızılötesi enerji daha az sıklıkla kullanılır, ancak uygulamaları, sıcak hava veya vakum kurutma ile birleştirildiğinde kuruma kinetiğini ve ürün kalitesini iyileştirebilir. Genel olarak, kabul edilen kurutma koşulları, AS'da bulunan ısıya duyarlı biyoaktif bileşiklerin muhtemel bozulmasına bağlıdır; sıcaklık- zaman protokollerindeki değişiklikler ayrıca distilasyon prosedürüne ve distile edilen bitki malzemesinin doğasına bağlı olabilir. Ayrıca, ekstraksiyon işlemini kolaylaştıracak uygun bir parçacık boyutuna ulaşmak için AS'ın öğütülmesi/toz haline getirilmesi de kuruma kinetiğini etkileyen başka bir faktördür. Uçucu yağların damıtılması nadiren %4-5'ten daha yüksek oranlarda verim sağlar (189).

Damıtma kalıntıları doğrudan çeşitli uygulamalarda kullanılabilir, ancak çoğu durumda aktif bileşiklerini, fenoller gibi konsantre etmek veya izole etmek için daha da işlenirler. Buna yönelik uygun bir yöntemin seçimi, fenolik bileşiklerinin iyi bir verim alınabilmesi için hayati öneme sahiptir. Bu yöntemlerin birçoğu diğer bitki matrisleri için kullanılanlarla benzerdir (190). Ancak diğerleri aromatik bitkilerin damıtma kalıntılarından fenolik bileşik bakımından zengin ekstre için özel olarak geliştirilmiş veya uyarlanmıştır. Katı kalıntılar, atık su ve hidrolatların özel fizikokimyasal özelliklere sahip olmasından dolayı, bu bileşiklerin izolasyonu için yaklaşımlar oldukça farklıdır. Katı kalıntılar, distilasyon işleminden kaynaklanan bitki materyalinin bir sonucudur. Geleneksel olarak, bunlar fırında biyokütle olarak yakılması için kullanılmıştır, aynı zamanda biyosorbentler olarak (148), vermikompostaj; vermikompostaj işlemiyle katı kalıntılar solucanlar yardımıyla organik gübreye dönüştürülebilir (191), hayvan yemi (192) veya takviye (148), kompost haline getirilip toprak verimliliğini arttırmak için kullanılabilir (189,193), mikroorganizma veya yabani ot kontrolü için tarım malçı (193), yapı malzemeleri için

biyoagregatlar (194), biyoteknolojik uygulamalar (28), gibi alanlarda kullanılmıştır. Bu bağlamda, toprak verimliliğinin restorasyonu ve korunması ve mikroorganizmalar tarafından neden olan toprak kaynaklı hastalıkların kontrolü veya selüloz üretimi için önermektedir (193).

Ekstraktın miktarı, ekstraktın toplam fenol içeriği ve hatta fenol profili, çözücü polaritesine bağlıdır. Farklı çözücüler karşılaştırıldığında, L. dentata'nın katı kalıntısının metanol ile ekstraksiyonunun, diklorometan ile karşılaştırıldığında ekstraksiyon veriminin 2.5 katından fazla arttığı ve toplam fenol içeriğinin üç katından fazla arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, etanolik ekstrakt, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanıydı (25). Bir veya diğer bir fenolün tercihli ekstraksiyonu da çözücüye bağlıdır. Örneğin, Chizzola ve ark. (2008), katı kalıntılardan rosmarinik asidin ekstraksiyonu için% 55 ila% 75 arasında etanol:su oranlarını önermektedir, ve diterpenik fenol türevlerini çıkarmak için daha yüksek oranlarda etanol kullanılması önerilir (24)

Uçucu yağların üretimi ile bitki biomasi arasındaki oran çok düşüktür, bu da önemli miktarda yan ürünlerin oluşmasına neden olur ve bu yan ürünlerin yönetilmesi gerekmektedir (11,12). 1 kg UY için 100 kg katı atık üretildiğini tahmin etmektedir. 2016'da sadece Fransa'da lavantaya (*Lavandula x intermedia*) ait uçucu yağın üretimi 1439 ton olarak gerçekleştiğine göre, bu, yılda 140.000 tonun üzerinde katı atık oluşturulduğu anlamına gelir (13). Aromatik bitkilerin damıtılmasından kaynaklanan yan ürünler karbon nötrdür, bu nedenle atmosferdeki karbondioksit seviyesinde ek bir artışa neden olmazlar ve döngüsel, sürdürülebilir ve ekolojik ekonominin prensipleriyle uyumlu olarak farklı kullanımlar için değerli bir malzeme olarak değerlendirilebilirler (14–16).

Bu bağlamda, Saha ve Basak, aromatik bitki damıtılması atıklarının potansiyel kullanımları ve değerlendirme alternatifleri hakkında literatürü kapsamlı bir şekilde incelemişlerdir: Biyoaktif fitokimyasallar, biyosorbentler, hayvan yemi, biyoyakıt, biyogaz üretimi, enzim sentezi, biyopestisitler, kelasyon ajanları, toprak iyileştiriciler, organik malç, biyokömür, kompost vb. Diğer yazarlar da, toprak yenilenmesi, yakıt kaynağı veya endüstriyel ilgiyi olan metabolitlerin üretilmesi için mikrobiyal biyotransformasyonlarda biyoteknik uygulamalar gibi diğer alternatifler önermişlerdir (28). Ayrıca, Saha ve Basak tarafından, bu atıkların biyoaktif fenolik

bileşiklerin kurtarılması için potansiyel olarak kullanılabilir kaynaklar olarak da gözden geçirilmesi önerilmiştir (148).

Fenolik bileşiklerin önemi, başlıca olarak antioksidanlar olmak üzere birçok biyolojik aktivitelerinde yatmaktadır, ancak aynı zamanda antiinflamatuar, yaşlanmayı geciktirici, sitotoksik ve antitümör, antidepresanlar, insanlarda kan lipitlerini ve glikozunu azaltma, biyolojik sistemleri makromoleküllerin oksidatif süreçlerin zararlı etkilerine karşı koruma, patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite, antidiyabetik aktivite, safra salgısını artırma, kan kolestrol ve lipid seviyelerini düşürme gibi çok önemli farklı görevleri de vardır. Ayrıca, fenolik bileşikler eczacılık, kozmetik, tarım veya tarım-endüstri gibi alanlarda kullanımı ve eldesi için araştırmalar noktasında çok çekici moleküllerdir (195,196).

Birçok araştırma, tarım ve gıda işleme endüstrilerinden farklı bitki artıklarının doğal fenolik bileşikler içeriğini, pazarını ve sürdürülebilirlik açısından incelenmiştir (197–201). Bu araştırmalar, tarım-endüstriyel yan ürünlerin fenolik bileşikler açısından zengin bir kaynak olduğunu ve doğal antioksidanlar için önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir (202). Ancak, distilasyon yan ürünlerinden fenollerin kurtarılmasıyla ilgili özel incelemeler, geniş çapta araştırılmasına ragmen. UY pazarından distilasyon yan ürünlerinin fenollerin kurtarılmasıyla ilgili özel incelemeler yapılmamıştır (28,148,203).

Sonuç olarak, uçucu yağ yan ürünleri, diğer bitki artıklarıyla karşılaştırılabilir ve fenolik bileşiklerin çok yönlü kaynaklarıdır. Bu yan ürünler, terpenik fenoller veya rosmarinik asit gibi aromatik bitkilere özgü bazı fenolik bileşikleri içerir ve örneğin antioksidanlar olarak büyük değer taşırlar. UY distilasyonunun bir sonucu olarak, farklı kimyasal profillere sahip birkaç tür yan ürün oluşturulur. Bu, yan ürünlerin oluşturulma şekline bağlı olarak fenolik profilleri etkileyebilir (204). Distilasyon sırasında hidroliz, termoliz, oksidasyon veya diğer kimyasal reaksiyonlar oluşabilir ve fenoliklerin verimliliği ve profili, kullanılan yöntem ve çözücülere bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, Akdeniz aromatik bitkilerin damıtma atıklarından fenolik bileşiklerin kurtarılması için potansiyel kaynaklar ve yöntemler hakkında mevcut bilginin toplanmasının ve bunların amaçlanan uygulamaya uygun şekilde kullanılmasının önemi vardır.

Katı artığın kimyasal bileşimi, distilasyon tekniğinden etkilenir. Özellikle, hidrodistilasyon sırasında aromatik bitkilerin kaynatılma süreci sonucunda, bazı bileşiklerin, özellikle polar olanların, atık suya sızması söz konusudur. Bu durum, belirli apolar fenoller aranıyorsa avantajlı olabilir, ancak amaç yüksek fenol içeriğine (yüksek toplam fenol içeriği) sahip fraksiyonlar elde etmekse dezavantajlı olabilir. Bunun aksine, bu işlem, bitkinin suya batırılmadığı buhar distilasyonunda ve SFME'de suyun kullanılan miktarlarının çok düşük olduğu durumlarda daha az önemlidir. Bu nedenle, SD ve SFME'den gelen katı artıkların, belirli polariteye sahip kimyasal bileşiklerin daha yüksek konsantrasyonlarını içermesi beklenmektedir (204). Naviglio® basınçlı ekstraksiyon sisteminin aromatik bitkilerin katı kalıntılarını çıkarmak için bir teknik olarak rapor edilmemiştir; ancak, domates biyokütle atıklarının, üzüm dalı atıklarının veya damıtılmamış Akdeniz aromatik bitkilerinin ekstraksiyonu için gözlenen umut verici sonuçlar mevcuttur, bunun aynı zamanda bu kalıntılar için de uygun olabileceğini önermektedir (205,206).

Teknik ve ekipman, ekstraksiyonun verimliliğini ve bileşimini etkileyen önemli bir unsurdur. Baydar ve ark., *R. x damascena*'nın katı kalıntıları için ekstraksiyon veriminde çözücüye bağlı olarak neredeyse iki kat farklılık gözlemlemişlerdir (Soxhlet veya UltraTurrax için), ancak ekstrakttaki fenol, flavanol ve flavonol yüzdelerinde fark gözlenmemiştir (207). Soxhlet'in ekstraksiyon verimini artırması nedeniyle, çıkarılan toplam fenol miktarı da daha yüksektir. S´anchez-Vioque ve ark., *C. ladanifer*'in katı kalıntısından etanolik ekstraksiyonlarda ultrases destekli ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir verim ve toplam fenol içeriği elde etmişlerdir (208). Bunun yanı sıra, pH değeri (190,209,210), ekstraksiyon süreleri (190,211,212), tuz ilavesi (210), kalıntı partikül boyutu (30,190), ekstraksiyon sıcaklıkları (24,190,212), yeterli ham madde bulunabilirliği (202), ekstraksiyon verimi (181,207), toksik bileşenlerin varlığı (213), mikrodalga gücü (214) gibi birçok diğer önemli faktör, fenolik bileşiklerin geri kazanımını etkileyebilir. Bu nedenle, her bir altbölüm için karşılaştırmalı analizlerin (faktöriyel tasarım) gerçekleştirilmesi, istenilen fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunun optimize edilmesi açısından son derece tavsiye edilir (212). Ekstraksiyonun ardından, çözünmüş bileşikleri içeren sıvı geri kazanılır ve genellikle kurutulur. Çözücünün uzaklaştırılmasının en yaygın yolu, rotavapor ile gerçekleştirilir (25,181,204,207), ayrıca diğer benzer vakum konsantreleyicilerle de yapılabilir (187,215,216).

Sonuç olarak, bitkisel kalıntılardan fenolik bileşiklerin eldesi için kullanılan yöntemlerin ve koşulların seçimi, elde edilen ürünlerin miktarı, kalitesi ve sürdürülebilirliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin etkili bir şekilde eldesi için uygun yöntemlerin belirlenmesi ve optimize edilmesi önemlidir.

Atık sular, damıtma sırasında aromatik bitkiden sızan bileşikleri içerir, hidrodistilasyon durumunda bir çeşit infüzyon olarak veya buhar distilasyonu sırasında bitki materyalinin geçişi sırasında yoğuşmuş suyun damlaması sonucunda oluşur. Atık sular için yeni uygulamalar, antioksidanlar, nutrasötik ve fonksiyonel gıda katkıları gıda antioksidanları, iltihap giderici ve tıbbi tedaviler, tirozinaz inhibitör aktivitesi gibi önerilmiştir (16,217,218,219). Zheljazkov ve Astatkie, atık suların aromatik bitkilere yaprak püskürtme uygulamasının bitki biomasisinin üretimini ve uçucu yağların verimini ve kompozisyonunu fitohormonlar gibi benzer bir şekilde iyileştirdiğini gözlemlemişler (220).

2.6. SEKONDER METABOLİTLER

Bitkilerin sekonder metabolitleri kimyasal olarak üç farklı ana gruba ayrılabilir: Terpenler, Fenolik bileşikler vd Azot içeren bileşikler olarak sınıflandırılır. Bu ana başlıklara ait bazı alt başlıklar aşağıda açıklanmıştır.

2.6.1. Alkaloidler

Bu, büyük ölçüde amonyak bileşiklerinden oluşan ve temel olarak amino asit yapı taşlarından sentezlenen azot bazlarını içeren ikincil kimyasal bileşiklerin en büyük grubudur. Aslında, alkaloit içinde bulunan bir veya daha fazla azot atomu, tipik olarak 1°, 2° veya 3° aminler olarak, alkaloitin bazikliğine katkıda bulunur. Baziklik derecesi, molekülün yapısına, ve fonksiyonel grupların varlığına ve konumuna bağlı olarak önemli ölçüde değişir (221). Asitlerle reaksiyona girerek su üretmeden kristal tuzlar oluştururlar (222). Çoğu alkaloit alkolde kolayca çözünür ve suda az çözünürler, ancak tuzları genellikle çözünürdür (223).

2.6.2. Glikozitler

Glikozitler genel olarak, şekerlerin (bazen polisakkaritler de dahil olmak üzere) çeşitli organik hidroksi (bazen tiyol) bileşiklerle (düzenli olarak monohidrat

karakterinde) kondensasyon ürünleri olarak tanımlanır, böylece karbohidratın hemiasetal birimi esasen kondensasyonda yer alır. Kimyasal olarak, glikozitler bir karbohidrat (glukoz) ve bir karbohidrat olmayan kısmı (aglikon veya jenin) içerir (222,224). Örnekler arasında kardiyak glikozitler (kalp üzerinde etki), antrasen glikozitler (müshil, cilt hastalıklarının tedavisi için), kalkon glikozit (antikanser), amarogentin, gentiopicrin, andrografolid, ailanthone ve polygalin bulunur (221).

2.6.3. Flavonoitler

Flavonoitler bitki florası arasında yaygın olarak bulunan önemli bir polifenol grubudur. Yapısal olarak, yapılarında birinden fazla benzen halkası bulunur (bir dizi C15 aromatik bileşik) ve birçok rapor, bunların antioksidanlar veya serbest radikal süpürücüleri olarak kullanımını destekler (224).

2.6.4. Fenolikler

Fenolik bileşikler veya polifenoller, bitki meyvelerinin renginden sorumlu doğal renk pigmentleri olarak yaygın olarak bulunan kimyasal bileşenlerdir. Bitkilerdeki fenolik bileşikler çoğunlukla fenilalanin üzerinden fenilalanin amonyak liyaz (PAL) etkisiyle sentezlenir. Bitkiler için çok önemlidirler ve birden fazla işlevi vardır (225). Fenolik bileşikler fenolik asitler, flavonoit polifenoller (flavononlar, flavonlar, ksantonlar ve kateşinler) ve non-flavonoid polifenolikler olmak üzere sınıflandırılır. Kafeik asit, bitki florasında yaygın olarak dağılmış fenolik bileşiklerin en yaygın olanı olarak kabul edilir ve onu insanlarda alerjik dermatite neden olan klorojenik asit izler (224).

2.6.5. Saponinler

"Saponin" terimi, bol miktarda saponin içeren ve bir zamanlar sabun olarak kullanılan *Saponaria vaccaria (Quillaja saponaria)* bitkisinden türetilmiştir. Dolayısıyla, saponinler su içinde 'sabunumsu' davranış sergiler, yani köpük oluştururlar (224). Steroidal saponinler, klinik kullanım için cinsiyet hormonlarının ticari üretiminde kullanılır. Örneğin, progesteron diosgeninden türetilir. Progesteron sentezi için en bol başlangıç maddesi, eski zamanlarda Meksika'dan sağlanan ve şimdi Çin'den sağlanan Dioscorea türlerinden izole edilen diosgenindir (221). Diğer steroidal hormonlar, örneğin kortizon ve hidrokortizon, Doğu Afrika'da yaygın olarak

bulunan Sisal yapraklarından izole edilebilen hecogenin başlangıç malzemesinden hazırlanmaktadır (221).

2.6.6. Terpenler

Terpenler doğal ürünler arasında en yaygın ve kimyasal olarak çeşitli gruplardan biridir. Bunlar, uçucu yağlarda, reçinelerde veya oleoresinlerde bulunan sıvı halde bulunan yanıcı doymamış hidrokarbonlardır (222). Terpenoidler bitki kökenli hidrokarbonlardır ve genel formülü (C_5H_8) şeklindedir ve karbon atomlarının sayısına bağlı olarak mono-, di-, tri- ve seskiterpenoidler olarak sınıflandırılırlar. Yaygın olarak önemli olan monoterpenler arasında terpinen-4-ol, tuyon, kamfor, eugenol ve mentol bulunmaktadır. Diterpenler (C_20), genellikle reçineler olarak kabul edilir ve kanser ilacı olan taxol yaygın bir örnektir. Triterpenler (C30), anti-enflamatuar, sedatif, böcek öldürücü veya sitotoksik aktiviteye sahip steroidler, steroller ve kalp glikozitlerini içerir. Yaygın triterpenler arasında amirinler, ursolik asit ve oleik asit bulunur (226).

2.6.7. *Mentha* Türlerinin Fitokimyasal Özellikleri

Bitkilerdeki ikincil metabolitler genellikle biyolojik olarak aktif bileşenlerin geniş bir kategorisi olan fenolik bileşiklerdir (227). En az bir aromatik halka içeren ve bir veya daha fazla hidroksil grubuna bağlı olan 8000'den fazla molekülü içerir. Bu bileşiklerin doğal kaynakları esterler ve glikozitlerdir (228). *Mentha* türleri çeşitli bileşiklere sahiptir, örneğin glikozitler, sinamik asitler ve aglikonlar ve/veya asillenmiş flavonoitler (6). *Mentha* türleri su ekstresi fenolik asit esterleri ve flavonoit türevlerini içermektedir (7). Kafeik asit türevleri, klorojenik ve rosmarinik asit *Mentha* cinsinin başlıca fenolik bileşikleridir (6,8,9). Ayrıca, bazı salvianolik asitler *Mentha* türlerin'de bulunmaktadır (8). *Mentha* türleri flavonoit de içerir, genellikle flavonlar ve flavanonlar şeklinde. *Mentha* spp.'de tanımlanan başlıca flavonlar luteolin ve türevleridir (8). Eriositrin, naringenin-7-O-glikozit, luteolin-7-O-glikozit, eriodiktiyol, izoroflolin, luteolin ve apigenin gibi diğer bazı bileşenler *Mentha* türleri'nin su ekstresinde bulunur (6,9). Areias ve arkadaşları ayrıca *Mentha* türleri'nin su ekstresinde başlıca bir bileşen olarak glikozit eriositrini göstermiştir (9). Ayrıca, başka bir araştırmada, hidrofobik metillenmiş flavonoid *M. aquatica, M. spicata* ve *M. piperita* yapraklarından izole edilmiştir. Bileşiğin 5,6-dihidroksi-7,8,30,40-

tetrametoksi flavon olarak tanımlandığı gözlemlenmiştir. *M. spicata* ve *M. piperita*'nın başlıca flavonoidi, *M. aquatica*'nın ise ana bileşeni olarak tanımlanan 5-hidroksi-6,7,8,40-tetrametoksi flavon tanımlanmıştır (229).

Mentha türleri içinde çeşitli biyoaktif bileşen kategorileri tanımlanmıştır. *M. spicata* ve *M. piperita* çeşitli iz elementleri içerir (230,231). *Mentha* türleri içinde triasilgliserol, diyasilgliserol ve serbest yağ asitlerinin varlığını tespit edilmiştir (232). Linoleik, linolenik ve palmitik asit, *M. piperita* yapraklarında bulunan başlıca bileşenlerdir (233). Ayrıca, ceramidlerin *M. longifolia* metanol ekstresinde bulunduğu rapor edilmiştir (234). Triterpenoidler ve steroidler *Mentha* türleri'nde bulunur (235). *M. spicata* neoxanthin, violaksantin, lutein ve zeaksantin gibi ksantofil bileşikler içerir (236,237). Lutein ve b-karoten izomerleri, kuru *M. piperita* çayında tanımlanmış olup, sadece luteinin infüzyon içinde var olduğu gösterilmiştir (238). İki tür vitamin, a- tokoferoller ve askorbik asit *Mentha* türleri'nde de bildirilmiştir (237,238). Şekerler, saponinler, alkaloidler, antrakinonlar ve kininlerin *Mentha* türleri'nde varlığı da rapor edilmiştir (239).

2.7. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

2.7.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller ve biyolojik sistem üzerindeki etkileri hakkında ilk ciddi bulgular, Denham Harman'ın 1956'da yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü üzerine yaptığı çalışmalarla öğrenilmeye başlandı. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin ikinci önemli keşfi ise McCord ve Fridovich'in 1969'da süperoksit dismutaz (SOD) keşfiyle gerçekleşti, bu da serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki önemine dair sağlam kanıtlar sunmuştu. Serbest radikallerin üçüncü keşif dönemi ise 1977'de Mittal ve Murad'ın hidroksil radikalinin (OH•), guanilat siklazın aktivasyonunu ve "ikinci haberci" siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu uyardığına dair kanıtlar sunmasıyla başladı (240). Daha sonra, biyolojik sistemlerin serbest radikallerle birlikte yaşama uyum sağladığı ve serbest radikallerin birçok fizyolojik fonksiyonda üretken bir şekilde kullanıldığı birçok kanıt sunulmuştur (241,242).

Oksijen, canlı organizmalardaki elektron taşıma zinciri yoluyla enerji üretimi için gereklidir, bu mekanizma hücrenin normal fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmesi için gereklidir (243). Bu, oksijenin yüksek redoks potansiyeline bağlıdır, bu da onu azaltılmış substratlardan elektronları kolayca kabul edebilen parlak bir oksidasyon ajanı yapar. Oksijenin bu çelişkili etkisi, yaşayan organizmalardaki antioksidan sistemlerin aşırı oksidasyona karşı koruma ve reaktif oksijen türleriyle (ROS) savaşmak için evrimleşmesini gerektirmiştir (241,244).

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronları nedeniyle yüksek reaktiflikte olan küçük difüzyon yetenekli moleküllerdir (241). Başlangıçta, serbest radikallerin oksijen merkezli radikaller olduğu düşünülüyordu ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılıyordu, ancak aynı zamanda reaktif azot türleri (RNS) alt grubunu da içerir ve bunların hepsi normal hücresel metabolizmanın bir ürünüdür (240). ROS ve RNS'nin biyolojik sistemlerdeki faydalı ve zararlı etki açısından iki farklı rol oynadığı belirlenmiştir (245). Faydalı rolleri düşük veya orta konsantrasyonlarda gerçekleşirken, zararlı etkiler, ROS/RNS üretiminin dengeleyici antioksidan yeteneğini aştığı yüksek konsantrasyonlarda meydana gelir. İkincil haberciler olarak, bu serbest radikaller normal fizyolojik süreçleri farklı aşamalarda keser ve biyolojik dokuların moleküler hasarına ve sinyal mekanizmalarına yol açan zararlı zincir reaksiyonlarını başlatırlar (246). ROS/RNS tarafından neden olan zararlı etki, oksidatif stres ve nitrozatif stres olarak adlandırılır (247). Aşırı ROS hücresel lipidlerin, proteinlerin veya DNA'nın zarar görmesine ve normal işlevlerinin bozulmasına neden olabilir (240). Canlı organizmadaki faydalı ve zararlı serbest radikal etkisinin dengede kalması, "redoks düzenlemesi" adı verilen bir mekanizma aracılığıyla sağlanır, böylece bir redoks homeostazı korunur (243).

Reaktif oksijen türlerinin üyeleri arasında tekli oksijen, süperoksit anyonu (O^{2-}•), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikal (ROO•) ve çok reaktif hidroksil radikal (OH•) bulunur. Reaktif azot türlerinden türeyen serbest radikaller arasında nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) bulunur (246). Serbest radikallerin dış kaynakları, radyasyon, ilaçlar, ksenobiyotikler, toksinler vb. olabilir (248). Serbest radikallerin endojen kaynakları ise genellikle daha karmaşık ve geniştir ve bazı örnekler aşağıda kısaca tartışılmıştır.

2.7.1.1. Mitokondri: Mitokondriler, ROS üretiminin en hayati kaynağıdır (246). Solunum zinciri aracılığıyla ATP üretimi sırasında, moleküler oksijen iki su molekülüne indirgenir (240). Ancak, enerji transdüksiyonu sırasında bazı elektronlar 'sızar' ve bu nedenle moleküler oksijenin yaklaşık %1-2'sinin süperoksit anyon radikaline dönüştürülmesi gerekmektedir. Süperoksit radikalinin kimyasal reaktivitesi, lipit zarından geçme yeteneğinin olmaması ve antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit'e hızlı dönüşümü nedeniyle nispeten zayıftır. Bununla birlikte, üretilen H_2O_2, Fenton reaksiyonunda demir ile reaksiyona girerek daha kimyasal reaktif bir molekül olan hidroksil radikalinin oluşumuna yol açabilir (246).

2.7.1.2. Hücresel oksidaz: Bu oksidazlar arasında NAD(P)H oksidazı (NOX ailesi) ve Ksantin oksidazı (XO) bulunur (240). NOX enzimleri, lenfositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, miyositler ve kondrositlerde bulunabilir ve orta düzeyde ROS üretilir ve enfeksiyonlara ve mikrobiyal istilaya maruz kalındığında hücresel tepkiyi düzenleyici olarak hareket ederler. Solunum patlaması, NADPH oksidaz enzim kompleksi aracılığıyla gerçekleşir ve bu, hücrelerin mikroplarla mücadelede kullandığı önemli bir savunma mekanizmasıdır (249).

2.7.1.3. Metal katalizli reaksiyonlar: Haber ve Weiss, süperoksit ve H2O2'nin (hidrojen peroksit) oldukça zararlı hidroksil radikalini (HO•) ürettiğini ve organik substratların Haber-Weiss reaksiyonu ile oksidasyonunu başlattığını göstermişlerdir (240).

$O^{2-}\bullet + H_2O_2 \longrightarrow HO\bullet + OH^- + O_2$ (Haber- Weiss Reaksiyonu).

Ancak, bu HO• üretmek için reaksiyonun devam etmesi için bir metalik katalizatöre (Cu^{2+} veya Fe^{3+}) ihtiyaç duyar ve bu, Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan geçiş metali aracılı kimyasal reaksiyonların bir kombinasyonudur (246)

$Fe^{3+} + O^{2-}\bullet \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$

$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO\bullet$ (Fenton reaksiyonu)

Haber-Weiss reaksiyonu ve Fenton reaksiyonu, serbest radikallerin oluşumunda önemli rol oynayan iki farklı kimyasal tepkidir.

2.7.1.4. Miyeloperoksidaz: Myeloperoksidaz, başlıca nötrofillerde bulunur ve daha düşük seviyelerde monositlerde ve eozinofillerde bulunur. Aşağıdaki tepkide görüldüğü gibi, hidrojen peroksit (H_2O_2), klorür (Cl^-) iyonlarıyla miyeloperoksidaz (MPO) enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonla başka bir serbest radikal olan HOCl'ye (hipokloröz asit) dönüştürülebilir (240)

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow HOCl + HO\bullet$$

Oksijenden türetilen radikaller, yaşayan organizmalarda oluşan en önemli serbest radikal sınıfını temsil eder (245). Bu bileşikler arasında ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen ($1O_2$) bulunur (250)

2.7.1.5. Superoksit: Moleküler oksijen (dioksijen), bir elektron alındığında süperoksit aniyon radikali ($O^{2-}\bullet$) oluşturur. Süperoksit anyon radikalı öncelikle ATP üretimi sırasında mitokondriyal elektron taşıma zincirinde üretilirler (240,245).

2.7.1.6. Hidrojen peroksit: Bu, süperoksit radikallerin dismutasyon reaksiyonunun bir ürünüdür (240). Fizyolojik koşullar altında, peroksizomlar H2O2'nin ana üreticileri ve tüketicileridir. Gerçekte serbest radikaller değildirler ancak serbest elektronlar içerirler. Bu nedenle, hücrelere zarar verebilecek biyomoleküllerle reaksiyona girme yetenekleri nedeniyle reaktif oksijen türleri olarak kabul edilirler (246). Ayrıca, sulu çözeltilerde yüksek çözünürlükleri biyolojik zarları kolayca geçirir ve onlara son derece zararlı özellikler kazandırır. Katalaz enzimi de peroksizomlarda bulunur ve H_2O_2'yi parçalayarak homeostatik bir denge sağlar (243).

2.7.1.7. Hidroksil radikali (OH•): Hidroksil radikali, çok yüksek reaktiviteye sahip olan hidroksit iyonunun nötr formudur ve bu da onu çok zararlı bir radikal yapar (240). Stres koşullarında, süperoksit radikalleri, Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile reaksiyona girecek olan "serbest demir"i demir içeren moleküllerden serbest bırakır (242).

2.7.1.8. Reaktif azot türleri (RNS): Reaktif azot türleri (RNS), yüksek oksidasyon yeteneğine sahip olan azot içeren serbest radikallerdir ve dolayısıyla oksidatif stresin teşvik edilmesinde rol oynarlar (247). Başlıca RNS'ler arasında nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO_2) yanı sıra peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi serbest radikaller bulunur (251).

2.7.2. Antioksidanlar

Serbest radikaller gibi, antioksidanlar endojen olarak üretilebilir (örneğin süperoksit dismutaz (SOD), indirgenmiş glutatyon (GSH) ayrıca biyolojik sistemde dışarıdan da alınabilir, genellikle diyet yoluyla antioksidanlar alınır (örneğin C vitamini, karotenoidler ve E vitamin) (250,252). Antioksidanlar öncelikle, bağırsakları inflamasyon ve yaralanmadan koruma mekanizmaları dahil olmak üzere, metabolik süreçler sırasında üretilen serbest radikalleri dengelemek için işlev görürler (244). Antioksidanların savunma sistemi hakkında üç temel yolla hareket ettiği söylenebilir; İlki proteinlerin serbest radikallerle reaksiyona girmesini engelleyerek: Bu mekanizma, proteinlerin serbest radikallerle etkileşimini önleyerek hücresel bileşenlerin korunmasına yardımcı olur. Böylece, hücre içindeki önemli proteinlerin fonksiyonları korunmuş olur. İkinci olarak geçiş metalleriyle bağlanmasını önleyerek ve dolayısıyla zararlı etkilerini inhibe ederek: Antioksidanlar, geçiş metalleriyle bağlanarak serbest radikal oluşturma sürecini engelleyebilir. Bu, metal katkılı radikallerin hücrelerde zararlı etkilere neden olmasını önler. Üçüncüsü Serbest radikalleri temizleme kapasitesine sahip küçük molekülleri mevcut hale getirerek: Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ve hücrelerin temizlenmesine yardımcı olarak oksidatif stresin etkilerini azaltır (253). Antioksidanlar enzimatik veya enzimatik olmayan olarak sınıflandırılabilir. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon sistemidir (244,254).

2.7.2.1. Süperoksit dismutaz: SOD'ler, hemen hemen tüm aerobik hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunan süperoksit anyonunun oksijen ve H_2O_2'ye parçalanmasını katalize edilmesi ile yakından ilişkili enzimlerdir (244). Ayrıca, üç formda SOD'un bulunduğu söylenir; SOD1 (sitosolde), SOD2 (mitokondride) ve SOD3 (hücre dışı), SOD1 ve SOD3'ün reaktif merkez olarak bakır ve çinko içerdiği ve SOD2'nin reaktif merkez olarak manganez içerdiği görülmüştür (246). Süperoksit dismutaz, süperoksiti hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürür (255).

2.7.2.2. Katalaz: Bu, oksijene maruz kalan hücrelerde baskındır ve genellikle H_2O_2'in oksijen ve suya parçalanmasını katalizlemek için sıkça kullanılır. Katalaz, tüm enzimler arasında en yüksek dönüş hızlarından birine sahiptir; bir katalaz molekülünün yaklaşık olarak her dakika 6 milyon molekül H_2O_2'i suya ve oksijene

dönüştürebilmesi mümkündür. Tüm organlarda bulunur, ancak özellikle karaciğerde bulunur (240,245).

2.7.2.3. Glutatyon sistemi: Glutatyon sistemi üç ana sınıftan oluşur; Glutatyon redüktaz, Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon S-transferaz (244).

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında Glutatyon (GSH), askorbik asit (C vitamini), tokoferoller ve tokotrienoller (E vitamini), ürik asit, melatonin, alfa lipoik asit bulunmaktadır (245).

2.2.7.4. Glutatyon: Glutatyon, hücrelerdeki bileşen amino asitlerden sentezlenir. Bu, bir sistein içeren peptittir. Sistein bileşiğindeki tiyol grubu, geri dönüşümlü olarak oksitlenip indirgenebilen bir indirgeyici ajandır. Hücrelerde, Glutatyon redüktaz olarak korunur ve daha sonra diğer metabolitleri ve enzim sistemlerini indirgerken hala oksidanlarla reaksiyona girebilir. Hücrelerin redoks durumunu korumada önemli bir rol oynar ve bu nedenle en önemli hücresel antioksidanlardan biri olarak kabul edilir (244).

2.7.2.5. Melatonin: Bu, hücre zarlarını ve kan-beyin bariyerini kolayca geçme yeteneğine sahip güçlü bir antioksidandır. Diğer antioksidanların aksine, melatonin redoks geri dönüşüme (tekrarlayan indirgeme ve oksidasyon) uğramaz; bir kez oksitlendiğinde önceki durumuna indirgenemez çünkü serbest radikallerle reaksiyona girdiğinde birkaç stabil son ürün oluşturur. Bu nedenle terminal antioksidan olarak adlandırılmıştır (244).

2.7.2.6. Askorbik asit: Vitamin C genellikle vücutta glutatyon ile olan reaksiyonuyla indirgenmiş formda tutulur, bu reaksiyon protein tarafından katalize edilebilir. C vitamini, nitrozamin oluşumunu önleyebilir, H_2O_2 gibi ROS'ları nötralize edebilir ve böylece bağışıklık yanıtını artırabilir (246).

2.7.2.7. Ürik asit: Plazmadaki antioksidan yeteneğinin yaklaşık yarısını oluşturur. Ürik asidin evrim sürecinde askorbatın yerine geçtiği düşünülmektedir (244). Askorbat gibi, ürik asit de serbest radikal türlerinin üretimini başlatma yeteneğine sahiptir.

ROS'un proteinler, DNA ve proteinler gibi hücre makromolekülleri üzerinde zararlı olduğu düşünülse de, lipid peroksidasyonunun etkileri arasında hücre zarının

akıcılığında değişiklikler, artmış zar geçirgenliği, dengeli bir konsantrasyon gradientini koruma yeteneğinde azalma ve iltihaplanma gibi etkilerin kolay yayılması nedeniyle lipid peroksidasyonunun son derece önemli olduğu öne sürülmüştür (256). Bu nedenle, lipid peroksidasyonunun son derece zararlı etkisi, hücre zarlarındaki lipid peroksidlerini başlıca indirgeyen bir antioksidan olan PH-GPx'nin öneminin büyümesine yol açmıştır. PH-GPx, hücre zarlarındaki fosfolipid hidroperoksidleri GSH veya diğer indirgeyici eşdeğerler kullanarak metabolize eder.

2.7.3. *Mentha* Türlerinin Antioksidan Aktiviteleri

Bitki ekstrelerinin antioksidan kapasitesini belirlemek için birkaç yöntem bulunmaktadır. Ancak, özütlerin kimyasal karmaşıklığı, kullanılan teste bağlı olarak farklı tekniklerden elde edilen dağınık sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle, tarama çalışmasında birden fazla deneme ile yaklaşmak son derece tavsiye edilir (257). Bu yöntemler arasında, iki in vitro DPPH• ve $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme aktivite analizi, ekstrelerin serbest radikal süpürme aktivitesini ve antioksidan kapasitesini değerlendirmek için yaygın ve yararlı yöntemler olarak kullanılmaktadır. Bunlar, hidrojen bağışlayıcı ve zincir kırıcı antioksidanların antioksidan aktivitesini belirlemede mükemmel araçlardır (258). Fenolik bileşikler, hidroksil gruplarına sahip olmalarından dolayı serbest radikalleri süpürme yetenekleri nedeniyle bitkisel materyallerin antioksidan aktivitelerine katkıda bulunan ana bileşikler olarak kabul edilir (259,260).

DPPH• radikal giderme aktivite analizi ile ilgili *Mentha* spp ekstreleri ile daha önce yapılan bir çalışmada en yüksek aktivite *M. piperita* için gözlemlenmiştir (IC_{50}=13,32 µg/mL), en düşük aktivite ise *M. spicata* için (IC_{50} = 87,89 µg/mL). Ekstraktların DPPH• radikal giderme aktivite IC_{50} değerleri şu sırayı izlemiştir: *M. piperita*<*M. pulegium*<*M. rotundifolia*≤*M. longifolia*<*M. spicata*. $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikalı gidere aktivitesinde elde edilen verilere göre, ekstraktlar bu radikal üzerinde konsantrasyona bağımlı bir aktiviteye sahip olduğu görülmüş ancak anlamlı bir fark görülmemiştir. Öte yandan, ekstraktlar, $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikalı gidere aktivitesinde DPPH• radikaline göre daha zayıf bir inhibisyon etkisine sahip olduğu bildirilmiştir. Analiz edilen ekstrelerin toplam fenolik bileşik içeriği önemli ölçüde farklılık göstermiş ve 150,91 ile 433,60 µg/mg arasında değişmiştir. *M. piperita* en yüksek TPC'ye sahip olurken (433,60±19,62 µg/mg), *M. spicata* ise en düşük içeriğe sahip

olduğu rapor edilmiştir (150,9±5,14 μg/mg). Ekstrelerin TPC'si azalan sırayla şöyleydi: *M. piperita>M. pulegium≥M. rotundifolia≥M. longifolia>M. spicata*. Bu nedenle, test edilen tüm bitkilerin fenolik bileşikler açısından zengin olduğu ve yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğu sonucuna varılabilir. Ekstrelerin $ABTS^{\bullet+}$ süpürme aktivitesi, DPPH• süpürme kapasitesinden farklıydı ve ikisi arasında bir korelasyon bulunamadı. Ekstraktların iki testteki davranışındaki fark, testlerdeki farklı kimyasal mekanizmalar ve radikallerin farklı kimyasal özellikleriyle açıklanabilir. Başka bir deyişle, antioksidan değerlendirmesinde kullanılan radikal sisteminin, test sonuçları üzerinde bazı etkileri vardır; örneğin, Ekstrelerin antioksidan bileşiklerle $ABTS^{\bullet+}$ ve DPPH• arasındaki tepkimelerin stoikiyometrisi farklıdır ve $ABTS^{\bullet+}$ ve DPPH•'nin ekstredeki bileşiklere göre elektron indirgeme potansiyelleri farklıdır. Ayrıca, radikallerin stereoselektivitesi, ekstrelerin radikallerle reaksiyona girmesinin kapasitesini etkileyebilir (261,262).

Ayrıca, anti-DPPH• potansiyeli ile TPC arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (r^2> 0,989, $p \leq 0,0005$). Bu korelasyon, fenolik içeriğin, *Mentha* türlerinin ekstrelerin antioksidan ve serbest radikal süpürme etkilerinin bir kısmından sorumlu olabileceğini öne sürmektedir. Ancak, ekstreler arasında TPC ve $ABTS^{\bullet+}$ değerleri arasında benzer bir ilişki gözlemlenmemiştir. Toplam ekstreler, farklı aktivitelere sahip birçok farklı bileşik karışımıdır (263).

Bu nedenle, test edilen türlerin $ABTS^{\bullet+}$ süpürme aktivitesi, karışımdaki fenoliklerin ve diğer bileşiklerin kompozisyonundan kaynaklanabilir ve bu da sinerjik bir etki gösterebilir. Genel olarak, Labiatae türleri, terpenoitler ve fenolik bileşiklerin zengin kaynaklarıdır. Bu nedenle, *Mentha* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin, en azından kısmen, antioksidan ve serbest radikal süpürme aktivitelerinden sorumlu olabileceği muhtemeldir. Ancak, fenolik bir yapıya sahip olmayan diğer bileşiklerin de bu bitkiler için bulunan antioksidan aktiviteyi kısmen açıklayabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmanın sonuçları, *Mentha* cinsinin uygun serbest radikal süpürücüler olduğunu ve biyolojik ve gıda sistemlerinde ROS saldırılarını sınırlayabilen primer antioksidanlar olduğunu göstermektedir.

Bilindiği gibi, antioksidanlar, reaktif oksijen türleri tarafından teşvik edilen organik madde oksidasyonunu yavaşlatma veya geciktirme potansiyeline sahiptirler

(264,265). ROS, hücresel bileşen hasarı ve oksidasyon-redüksiyon potansiyel dengesizliği olduğunda meydana gelen bir dizi insan hastalığının gelişiminde rol oynar. Bu durumda, endojen hücresel antioksidan savunma sistemi (örneğin glutatyon, katalaz) aşırı miktarda ROS'u uzaklaştıramaz (266). Oksidatif stres, geniş bir hastalık yelpazesinin ana nedeni olarak gösterilmiştir. Kanserler, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, ROS'un katılımına dair güçlü kanıtlar göstermektedir (264). Bunun karşısında, doğal antioksidan fitokimyasalların alımının, bu hastalıkların riskinin azalması ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir (267).

Lv ve ark., hem geleneksel hem de organik nane asetonik ekstrelerin antioksidan potansiyelini karşılaştırdığı çalışmada, iki ürün arasında anlamlı bir fark bulamadıklarını rapor etmişler (268). Diğer bir çalışmada, yeşil çay, nane ve farklı bitki türleri üzerine araştırmalar yapılmış. Sonuçlara göre, yeşil çay özütleri, toplam fenolik içerik (TPC) ve antioksidan potansiyel açısından anlamlı derecede ($P < 0,05$) daha yüksek değerlere sahip bulunmuştur. Farklı bitkiler arasında yapılan karşılaştırmada, nane türlerinin daha iyi metal şelatörleri olduğu gözlemlenmiştir. Bu özellik, nane bitkilerinde bulunan rosmarinik ve kafeik asitler gibi metal şelatlayıcı ajanların varlığına bağlanabilir. Metal şelatörleri, metal iyonları ile koordinatif bağlar oluşturarak, bu iyonları stabilize ederler ve redoks potansiyellerini düşürürler. Bu süreç, metal iyonlarının oksitlenmiş formlarını stabilize eder ve onları daha az reaktif hale getirir. Böylece, şelatörler ikincil antioksidanlar olarak görev yapar ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı azaltır. Nane türlerinin bu şelatlama kapasitesi, onları güçlü antioksidan özelliklere sahip kılar (26).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız iki ana hedef üzerine planlanmıştır. İlk olarak, nane çeşitlerinin fenolik bileşik profillerinin belirlenmesi ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesiyle, literatüre yeni verilerin kazandırılması hedeflenmiştir. İkinci olarak da, sıklıkla kullanılan nane çeşitlerinden elde edilen uçucu yağların ardından kalan katı ve sıvı atıkların sıcaklık ve diğer bozunma faktörlerinden nasıl etkilendiğinin belirlenmesidir.

Bu kapsamda öncelikle kurutulmuş naneler iki gruba ayrılmıştır ilk grup nane %70 etanol/su ile ekstreler elde edilmiştir (A grubu ekstre). İkinci grup nanelerden hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağ alındıktan sonra. Distilasyon sonrası kalan katı atık preslenmiş ve sudan arındırılmıştır. Bu katı atık nanenin %70 etanol/su ile ekstraksiyon yapılarak ekstre elde edilmiştir (B grubu ekstre). Distilasyon sonrası geri de kalan atık su alınarak liyofilize edilmiş ve ekstresi elde edilmiştir (S grubu ekstre). Sonra bu ekstrelerin bireysel fenolik bileşik analizleri kromatografik olarak kantitatif analizleri ve antioksidan aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.1. BİTKİSEL MATERYAL

Bu çalışmada 3 farklı *Mentha* türüne ait 11 çeşit/klon araştırılmıştır. Kullanılan *Mentha* türleri *Mentha x piperita* L., *Mentha arvensis* L. ve *Mentha x dumetorum* Schult.'dur. Çalışılan 8 çeşit (Chocolate, Citaro, Multimentha, Swiss, Basilicuminze, Black Mitcham ve Granada) ile bir klon (Piper-1). Araştırmada kullanılan bitki materyali, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme alanlarında TÜBİTAK 120 O 511 nolu proje kapsamında yetiştirilen örneklerden temin edilmiştir. Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi olan Prof. Dr. İsa Telci, bu bitkilerin tescilli çeşitlerinden kontrollü bir şekilde yetiştiriciliğini yaptığını ve temin edilen *Mentha* türlerinin, tür sertifika bilgilerinin üviversite envanterinde kayıtlı olduğunu tarafımızla paylaşmıştır.

Mentha türleri 2022 yılının Ağustos-Eylül aylarında hasat edilmiş. Daha sonra gölgede kurutma tekniği ile kurutularak herbalar kurutulup toplanmıştır. Laboratuvar

çalışmalarının yapılabilmesi için Sağlık Bilimleri Üniversitesi DETUAM (Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi) Validebağ Araştırma Parkına getirilmiş. Burada ileri analizleri gerçekleştirilmiştir.



A



B



C



D



E



F



G



H



I



J



K

A: *Mentha arvensis*, B: *Mentha x dumetorum*, C: *M. piperita* 'Black mitcham', D: *M. piperita* 'Basilicuminze', E: *M. piperita 'Chochlatte'*, F: *M. piperita* 'Citaro', G: *M. piperita* 'Granada', H: *M. piperita* 'Multimentha', I: *M. piperita* Piper-1, J: *M. piperita* 'Swiss' ve K: *M. piperita* 'Yakima'

Resim 3.1: Bitkilerin fotoğrafları



Resim 3.2: Kurutulmuş ve çalışmamızda kullanılan nane çeşitleri

Tablo 3.1: *Mentha* türlerinin hasat tarihleri

	***Mentha* Türü**	**Hasat Tarihi**
1	*M. piperita* Piper-1	19.08.22
2	*M. piperita* 'Chocolate'	21.09.22
3	*M. piperita* 'Citaro'	21.09.22
4	*M. piperita* 'Multimentha'	06.08.22
5	*M. piperita* 'Swiss'	07.08.22
6	*M. piperita* 'Yakima'	06.08.22
7	*M. piperita* 'Basilicuminze'	02.09.22
8	*M. piperita* 'Black mitcham'	10.08.22
9	*M. dumetorum*	21.09.22
10	*M. piperita* 'Granada'	21.09.22
11	*M. arvensis*	10.08.22

3.2. KİMYASAL MALZEMELER

3.2.1. Kullanılan Çözücü ve Kimyasal Maddeler

- Etanol (Ethanol, CAS Number: 64-17-5) (Sigma-Aldrich, Almanya) Hekzan (Hexane, CAS Number: 110-54-3) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Etil asetat (Ethyl acetate, CAS Number: 141-78-6) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- HCl (Hydrochloric acid, CAS Number: 7647-01-0) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, CAS Number: 30931-67-0) (Sigma-Aldrich, Almanya),
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•, CAS Number: 1898-66-4) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, CAS Number: 53188-07-1) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Bakır (II) klorür çözeltisi (Copper (II) chloride, CAS Number: 7447-39-4) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Neokuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline, CAS Number: 581-47-5) (Sigma-Aldrich, Almanya)

- Amonyum asetat (Ammonium acetate, CAS Number: 631-61-8) (ISOLAB, Almanya) 2,4,6-Tripyridyl-S-triazine (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine, CAS Number: 3682-35-7) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- FeSO4 (Iron (II) sulfate, CAS Number: 7720-78-7) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- FeCl3 (Iron (III) chloride, CAS Number: 7705-08-0) (Sigma-Aldrich, Almanya), Potasyum persülfat (Potassium peroxydisulfate, CAS Number: 7727-21-1) (ISOLAB, Almanya)
- Potasyum fosfat dibazik (Dipotassium phosphate, CAS Number: 7758-11-4) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Asetonitril (Acetonitrile, CAS Number: 75-05-8) (Merck, Almanya).

3.2.2. Fenolik Bileşik Standartları

- Gallic acid, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 149-91-7, Product No. PHL89198
- 4-hydroxybenzoic acid, 99.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 99-96-7, Product No. PHL83051
- Chlorogenic acid, ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 327-97-9, Product No. PHL89175
- Vanilic acid, ≥97.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 121-34-6, Product No. 94770
- Caffeic acid, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 331-39-5, Product No. C0625
- Epicatechin, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 490-46-0, Product No. E4018
- p-Coumaric acid, ≥98.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 501-98-4, Product No. C9008
- Ferulic acid, ≥99.0% (HPLC), Supelco CAS Number: 1135-24-6, Product No. 90034

- Salicylic acid, ≥99.0%, Sigma Aldrich CAS Number: 69-72-7, Product No. PHL80529
- Rutin ≥94.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 207671-50-9, Product No. R5143
- Chicoric acid, ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 6537-80-0, Product No. C7243
- Apigenin-7-glucoside, ≥97.0% (HPLC), Supelco CAS Number: 578-74-5, Product No. 44692
- Cinnamic acid, ≥99.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 140-10-3, Product No. 8.00235
- Quercetin, ≥95.0% (HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 117-39-5, Product No. Q4951
- Naringenin, ≥95.0%(HPLC), Sigma Aldrich CAS Number: 67604-48-2, Product No. PHL89738

3.3. KULLANILAN ALET VE GEREÇLER

- Rotary Evoporator (Buchi, İsviçre)
- Manyetik karıştırıcı: (Isaolab, Almanya)
- Orbital çalkalayıcı: (Onilab, ABD)
- Ultrasound Sonikatör: (Isolab, İstanbul, Türkiye)
- Liyofilizatör (Buchi, İsviçre)
- pH metre (Hanna, ABD)
- Spektrofotometre mikroplak okuyucu: (BioTek Synergy NEO2, ABD)
- Derin Donrurucu (-86 ºC): (PHCbi, Japonya)
- HPLC: Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus HPLC ve PDA Dedektör (Shimadzu, Kyoto, Japonya)
- HPLC Kolonu: Phenylhexyl 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) C18 Kolon (GL Sciences InterSustain, Japan)

- Clevenger Düzeneği (İldam cam, Türkiye)
- Buzdolabı: (Bosch, Türkiye)

3.4. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.4.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Mentha türlerinin kurutulmuş herbaları öğütücü ile toz haline getirildi. İlk grup elde edeceğimiz ekstre için behere 5 gr öğütülmüş kuru bitki üzerine 200 mL%70 lik etanol/su eklendi ve orbital çalkalayıcıda 2 saat karıştırılması sağlanmıştır. Daha sonra ekstrelerin verimini artırmak için ekstreler 24 saat bekletilmiştir, 24 saat sonrasında ekstreler filtre kağıdı ile erlen kabına süzülen ekstre çözeltisinden katı kalıntıların ayrışması sağlanmıştır. Daha sonra tekrar behere alınan ekstre rotary evaporatör cihazı kullanılarak ekstere içinde yer alan etanol ve suyun uzaklaştırılması sağlanarak, yoğun kıvamlı ekstre elde edilmiştir. Elde edilen bu ekstreler ultra derin dondurucuda -86 ºC derece de 2 gün bekletilerek dondurulmuştur. Dondurulan ekstreler liyofilizatör cihazına alınmış ve 6 gün boyunca liyofilizatörde kalmıştır. Daha sonra liyofilizasyon işlemi sonlandırılarak elde edilen ekstreler tartılarak amber renkli cam saklama kabına alınmıştır. Bu ekstreler bundan sonra A olarak anılacaktır.

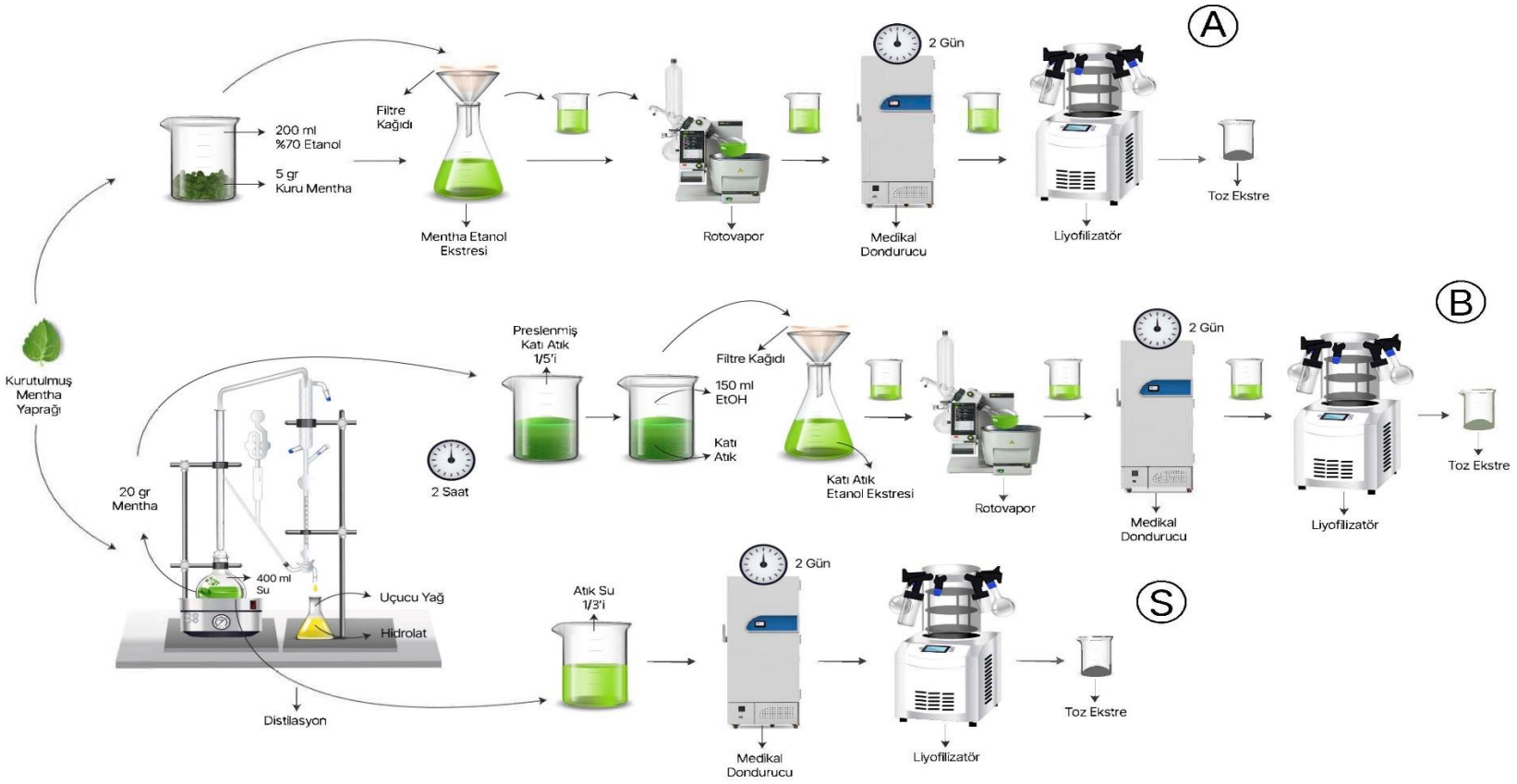
Uçucu yağların çoğunun suyun kaynama noktasından daha yüksek olan kaynama noktalarına sahip olmalarına rağmen, su buharıyla sürüklenebilme özellikleri ve su buharının kısmi basıncının etkisiyle, normal kaynama noktalarının altındaki sıcaklıklarda buharlaştırılabilmektedirler (270). İkinci grupta, elde edeceğimiz ekstreler için su distilasyon yöntemi kullanılmış olup damıtma düzeneğimiz de distilasyon için 20 gr öğütülmüş bitki örnekleri balona konulmuş üzerlerine 400 mL distile su eklenmiştir. Distilasyon işlemi herbir *Mentha* türü için iki saat sürmüştür. Distilasyon işlemi sonrası örneklerden uçucu yağ ve hidrolat elde edilmiştir. Ayrıca işlem sonrası atık su ve kalıntı katı atık ürünleri balon içerisinde yer almaktadır. Kalıntı ürünlerin değerlendirilmesi için ekstraksiyon yöntemleri oluşturulmuştur.

Katı atık materyal ekstresi için izlenmiş olan yol; öncelikle kalıntı materyal preslenerek su katı materyalden uzaklaştırılmıştır, ardından kalan ürün tartılmış ve tartılan bu ürünün 5'te 1'i beher kabına alındı üzerine 150 mL %70'lik etanol/su

eklendi. Bu çözelti orbital çalkalayıcı da 2 saat karıştırılmıştır ve daha sonra etanol/su çözeltisi içinde 24 saat bekletilmiştir. Hazırlanan sıvı ekstreler daha sonra filtre kâğıdı ile erlen kaba süzülmüştür. Katı atıklar filtre kağıdında kalmış olup sıvı ekstreler erlen kabına alınmıştır. Elde edilen bu ekstreler beher kaba alınmış ve rotavapor cihazı kullanılarak ekstere içinde yer alan etanol ve suyun uçurulması sağlanarak, katı atık materyal ekstreler elde edilmiştir. Bu ekstreler ultra derin dondurucuya konularak -86ºC derecede dondurulmuştur. Daha sonra liyofilizatöre alınmış ve altı gün boyunca liyofilizatör de kalmıştır. Ekstreler toz forma gelmiş ve toz ekstreler tartılarak amber renkli cam şişelere alınmıştır. Bu ekstreler bundan sonra B olarak adlandırılacaktır.

Atık su ekstresi için izlenen yol; elde edilen atık su filtre kağıdından süzülmüş ve sıvı kısım erlene alınmıştır. Alınan sıvı kısımın 1/3 ü sonrasıda behere alınıp ultra derin dondurucuda -86 ºC derece de 2 gün bekletilmiş. Daha sonra liyofilizatöre alınarak sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Atık sudan elde edilen ekstreler toz forma gelmiş ve toz ekstreler tartılarak amber renkli cam şişelere alınmıştır. Elde edilen toz ekstreler, bundan sonra S olarak adlandırılacaktır. *Mentha* türlerinin ve atık ürünlerinin ekstraksiyon yöntemleri Şekil 3.1 te gösterilmiştir. Gerçekleştirilen ekstre elde etme süreçleri ve laboratuvar çalışmalarına ait görseller EK-1 ‘de gösterilmiştir.

HPLC için A, B ve S grubundan elde edilen ekstrelerden 5mg alınıp 1 mL acetonitril 4 mL distile su kullanılarak 1mg/mL olacak şekilde stok çözelti hazırlanıp HPLC analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.1: *Mentha* türlerinin ve atık ürünlerinin ekstraksiyon yöntemleri

3.4.2. Ekstrelerin HPLC Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

Fenolik bileşiklerin bitki ekstrelerindeki miktarlarını belirlemek için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus model HPLC cihazı kullanıldı, dedektör olarak fotodiyot detektörü (PDA) tercih edildi. Analizde, GL Sciences InterSustain marka Fenilheksil 3 μm, 4,6 mm x 150 mm boyutlarında C6 ters faz kolonu kullanıldı. Mobil faz olarak asetonitril (Mobil faz B) ve su (%0,1 formik asit) (Mobil faz A) kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlandı ve mobil faz akış hızı dakikada 1mL olarak belirlendi.

Her bitki ekstresi ve standart için 1 mg/mL stok çözeltiler hazırlandı. Standart bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerle kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Böylece, ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik miktarları kantitatif olarak belirlendi. Kalibrasyon sürecinde 16 farklı fenolik bileşik kullanıldı, bunlar; 4-Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, vanilik asit, apigenin-7-O- glikozit, salisilik asit, epikateşin, naringenin ve eriositrin. Her bir fenolik bileşik, maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (nm) değerlendirilerek kantitatif hesplamalar yapıldı. Her ekstre yöntemi ve 11 farklı nane çeşiti için değerlendirilen fenolik bileşiklerden bazıları HPLC'de dedekte edilemedi ve bunlar değerlendirmelerden çıkarıldı. Bunlar; 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, epikateşin, salisilik asit, sinamik asit. EK-2 ve EK-3 te yapılan analiz sonuçlarından *Mentha x piperita* piper 1 türünün A grubu ekstrelerinin HPLC analiz sonuçları gösterilmiştir.

3.4.3. Antioksidan Aktivite Analizleri

3.4.3.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radikali giderme aktivitesi: DPPH• radikali giderme aktivitesi, ortamda bulunan antioksidan maddeler tarafından indirgenerek mor renkli DPPH• radikalinden sarı renkli DPPH• molekülüne dönüşmesiyle absorbans değerlerinin azalmasına dayanır (96). DPPH• çözeltisi, 0,1 mM konsantrasyonda etanol çözücüsünde hazırlandı. Bulguları karşılaştırmak amacıyla 6- hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Trolox) standardı, altı farklı konsantrasyonda hazırlandı. Mikroplaka kuyucuklarına ekstrelerin farklı konsantrasyonları ve standart çözeltisi eklenerek, ardından 190 μL DPPH• çözeltisi ilave edildi. Karışım çalkalandıktan sonra 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve

karanlıkta inkübe edildi. DPPH• çözeltisinin mor renginin sarı renge dönüşmesi, DPPH• radikal giderilmesinin bir göstergesidir. Bu karışımların ve pozitif kontrolün (DPPH•) negatif kontrole (etanol) karşı absorbansları, 517 nm'de mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Ekstrelerin ve standardın DPPH• radikalleri giderici kapasiteleri, belirli bir denklemle hesaplandı. Grafik eğrisi denkleminden IC_{50} değerleri hesaplanarak %50 radikal gidermeyi (inhibisyon) sağlayan konsantrasyonlar belirlendi. EK-5 te hazırlık aşamasında mikroplaklar göstrerilmiştir.

Analizler gerçekleştirilirken *Mentha* türlerinin ekstrelerinden 4 farklı konsantrasyonlarda, 3 tekrarlı olacak şekilde tekrarlandı. Bu 4 farklı konsantrasyonlardan 10 µL alındı ve üzerlerine 190 µL DPPH• çözeltisinden eklendi. 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml son konsantrasyonlar elde edildi.

Mentha türlerinin radikal giderme aktivitesi hesaplaması şu şekilde yapılmaktadır:

DPPH• Radikali giderme aktivitesi: (A0-A1/A0) x 100

A0: Kontrol (DPPH•) absorbansı; A1: Standardın (Trolox) veya ekstrelerin absorbansı

3.4.3.2. 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{\bullet+}$) radikali giderme aktivitesi: $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme aktivitesi, ortamda oluşturulan yeşil renkli $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonunun antioksidan maddeler tarafından indirgenerek renksiz ABTS•+ moleküllerinin absorbans değerlerini düşürmesi prensibine dayanır (97). $ABTS^{\bullet+}$ radikali, 7 mM ABTS•+ çözeltisinin 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi içinde ortalama 12-16 saat inkübe edildikten sonra oluşur. Bu radikal oldukça kararlıdır ve koyu yeşil bir renk gösterir. Çözelti daha sonra su ile seyreltilerek 734 nm'deki absorbansı yaklaşık olarak ~0.7 olacak şekilde ayarlanır. Bulguları karşılaştırmak amacıyla Trolox standardı farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Trolox standartı ve ekstrelerin farklı konsantrasyonlarından alınan 10 µL'lük örnekler, mikroplaka kuyucuklarına eklenerek, ardından 190 µL $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi ilave edilir ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Numunelerin ABTS•+ çözeltisi ile karıştırılması sonucunda renk açılması, $ABTS^{\bullet+}$ radikal gidermesinin bir göstergesidir. Örneklerin absorbans değerleri 734 nm'de mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçülür ve $ABTS^{\bullet+}$ radikallerinin giderici kapasiteleri aşağıda verilen

denklemle hesaplanır. Grafik eğrisi denklemleri kullanılarak ABTS•$^{+}$ radikalini %50 oranında inhibe eden konsantrasyonlar (IC_{50} değerleri) hesaplanır. ABTS•$^{+}$ yönteminde kullanılan mikroplaklar EK-6 da gösterilmiştir.

Analizler gerçekleştirilirken *Mentha* türlerinin ekstrelerinden 4 farklı konsantrasyonlarda, 3 tekrarlı olacak şekilde tekrarlandı. Bu 4 farklı konsantrasyonlardan 10 µL alındı ve üzerlerine 190 µL ABTS•+ çözeltisinden eklendi. 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml son konsantrasyonlar elde edildi.

Mentha türlerinin ABTS•+ radikal giderme aktivitesi:

ABTS•$^{+}$ Radikali giderme aktivitesi: (A0-A1/A0) x 100

A0: Kontrol (ABTS•$^{+}$) absorbansı; A1: Standardın (Trolox) ve ekstrelerin absorbansı

3.4.3.3. Bakır (II) (Cu^{2+}) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC): Cuprac testinde, başlangıçta neokuproin-bakır (II) kompleksi, renksizdir. Ancak, antioksidan varlığında, Cu (II) kompleksi hızla Cu(I) kompleksine indirgenir ve bu indirgenmiş kompleks renkli bir bileşik oluşturur. Bu kompleks, mavi renkten yeşile doğru değişebilir. Yani, Cuprac testinde renk değişimi genellikle mavi renkten yeşile doğru olur. Bu renk değişimi, antioksidan varlığının tespiti için kullanılır. Antioksidan varlığında, Cu (II) kompleksi hızla Cu(I) kompleksine indirgenir ve indirgenmiş kompleksin absorbansı artar (98). Deney için; 7,5 mM'lik Neokuproin (2,9-dimetil-1,10- fenantrolin) çözeltisi etanol ile, 10 mM'lik Bakır (II) klorür çözeltisi ve pH'sı 7.0 olan 1M amonyum asetat tamponu su ile hazırlandı. Pozitif kontrol için farklı konsantrasyonlarda Trolox standardı hazırlandı. Kuyucuklara sırasıyla 50 µL bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponu eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra, farklı konsantrasyonlardaki ekstre ve standart çözeltileri 100 µL olarak eklenerek 37°C'de karanlıkta bekletildi. Aktivite sonucunda turuncu renkte bir kompleks oluştu. İnkübasyon sonunda örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Trolox'un farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafik denklemi kullanılarak bitki ekstrelerinin indirgeme gücü kapasiteleri, gram ekstre başına mmol Trolox eşdeğeri (mmol TEAC/g ekstre) olarak hesaplandı.

3.4.3.4. Demir (III) (Fe^{3+}) iyonu indirgeyici gücü antioksidan aktivitesi (FRAP): Demir (III)'ün indirgenme kapasitesi tayini, Fe (III)'ün, 2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ) ile reaksiyonu sonucu oluşan turuncu-açık kahverengi renkli [Fe (III)-TPTZ] kompleksinin antioksidanların etkisiyle koyu mavi-mor renkli Fe (II)-TPTZ kompleksine indirgenmesiyle absorbans değerlerinin artması prensibine dayanır (99). FRAP reaktifi, 40 mM HCl içinde hazırlanmış 10 mM 2,4,6-Tripyridyl-S-triazine çözeltisi ile suda hazırlanmış 20 mM'lık FeCl3 çözeltisinden 1'er mL alınıp, 300 mM'lık asetat tamponundan (pH 3,6) 10 mL alınıp karıştırılarak hazırlandı ve 37°C'de ısıtıldı. Pozitif kontrol olarak farklı konsantrasyonlarda demir sülfat ($FeSO_4$) çözeltileri hazırlandı. Her bir ekstrein farklı konsantrasyonları ve standartlar kuyucuklara 10'ar µL eklendikten sonra üzerine 300 µL taze hazırlanmış FRAP reaktifi eklendi. Reaksiyon karışımları 37°C'de 4 dakika süreyle inkübe edildi. 593 nm'de absorbans değerleri okundu. Standart olarak kullanılan demir sülfatın farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafik denklemi kullanılarak bitki ekstrelerinin indirgeme gücü gram ekstre başına mmol Fe^{2+} eşdeğeri (mmol Fe^{2+}/g ekstre) olarak hesaplandı.

3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiklerin yapılabilmesi için Graphpad Prism 8 programı kullanılmıştır. İki yönlü ANOVA, iki faktörün (bağımsız değişkenin) etkisini değerlendirmek için kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir. Bu faktörler, genellikle kategorik değişkenlerdir ve her biri birden fazla seviyeye sahip olabilir. İki yönlü ANOVA, her iki faktörün etkisini değerlendirir ve bu faktörler arasındaki etkileşimi de kontrol eder. Yani, bu analiz yöntemi, her iki faktörün ve bu faktörler arasındaki etkileşimin bağımlı değişken üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılır. Yaptığımız çalışmada Ekstraksiyon Metotlarının farklılığı fenolik bileşikler üzerine nasıl etki ettiği istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

Tukey testi, ANOVA analizinin sonuçlarına dayanarak gruplar arasındaki farkları belirlemek için kullanılan bir post-hoc testtir. Post-hoc testlerin amacı, çoklu karşılaştırmalar yaparken yanlış pozitif sonuçların kontrolünü sağlamaktır. Yani, gerçekten var olmayan farkları tespit etme olasılığını azaltmaktır. ANOVA, genellikle gruplar arasında genel bir fark olduğunu gösterir, ancak hangi grupların birbirinden farklı olduğunu belirtmez. Tukey testi, bu farkları belirlemek ve hangi grupların

istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olduğunu belirlemek için kullanılır. Bu test, farklı grupların birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için çiftler halinde karşılaştırmalar yapar ve her karşılaştırma için bir güven aralığı belirler. Eğer iki grup arasındaki fark, belirlenen güven aralığının dışındaysa, bu gruplar istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı kabul edilir. Bu nedenle, Tukey testi, ANOVA analizinin sonuçlarını daha ayrıntılı olarak incelemek ve gruplar arasındaki farkları belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Antioksidan Aktivite tayinlerinin fenolik bileşiklerle nasıl bir korelasyon içerisinde olduğunu tespit etmek için Pearson korelasyon testi kullanılmıştır, bu test iki sürekli değişken arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir istatistiksel testtir, ilişkinin gücünü ve yönünü belirlemek için kullanılır. Korelasyon katsayısı, -1 ile +1 arasında bir değer alır: +1, mükemmel pozitif ilişkiyi temsil eder. 0, iki değişken arasında ilişki olmadığını gösterir. -1, mükemmel negatif ilişkiyi temsil eder.

Pearson korelasyon testi, iki değişken arasındaki ilişkinin lineer olduğunu varsayar. İki değişkenin normal dağılıma sahip olduğu ve lineer bir ilişki içinde olduğu durumlarda kullanılır. Bu test, korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek için hipotez testi olarak kullanılır.

4. BULGULAR

4.1. EKSTRELERİN HAZILANMASINDAKİ VERİLER VE VERİM

Mentha türlerinden üç farklı şekilde ekstreler elde edilmiştir. Öncelikle 11 farklı *Mentha* türünden 5 gr kuru madde alınmış %70 etanol/su ile ekstrakte edilmiş ve bu grup A olarak isimlendirilmiştir (Tablo 4.1). İkinci olarak su distilasyon yöntemi kullanılmış olup damıtma düzeneğimiz için 20 gr öğütülmüş kuru *Mentha* herbaları bolona konulmuş üzerlerine 400 mL distile su eklenmiştir. Distilasyon işlemi herbir *Mentha* türü için iki saat sürmüştür. Distilasyon işlemi sonrası; atık su (S) ve katı atık (B) miktarları tespit edilmiştir. Kalan atık su miktarlarının 3'te 1'i alınarak liyofilize edilmiş ve S grubu ekstreler elde edilmiştir. Kullanılan nane miktarları ve elde edilen veriler Tablo 4.2'de verilmiştir. Katı atık miktarlarının 5'te 1'i alınarak gerekli işlemlerden sonra %70 etanol ile ekstrakte edilmiş ve B grubu ekstreler elde edilmiştir. Bu kısım ile ilgili elde edilen veriler Tablo 4.3'te verilmiştir. Her grup için elde edilen esktre verimleri yüzde olarak hesaplanmış ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan nane çeşitleri ve ekstraksiyon için alınma miktarları

Grup	*Mentha* Türleri	Ekstre (gr)
1A	***M. piperita* Piper-1**	5
2A	***M. piperita* Chocolate**	5
3A	***M. piperita* Citaro**	5
4A	***M. piperita* Multimentha**	5
5A	***M. piperita* Swiss**	5
6A	***M. piperita* Yakima**	5
7A	***M. piperita* Basilicuminze**	5
8A	***M. piperita* Black mitcham**	5
9A	***M. dumetorum***	5
10A	***M. piperita* Granada**	5
11A	***M. arvensis***	5

Tablo 4.2: Atık su ekstresine alınan su miktaları

Grup	*Mentha* Türleri	Atık Su (mL)	Liyofize Edilen Miktar (mL)
1S	***M. piperita*** Piper-1	270	90
2S	***M. piperita*** **Chocolate**	300	100
3S	***M. piperita*** **Citaro**	270	90
4S	***M. piperita*** **Multimentha**	300	100
5S	***M. piperita*** **Swiss**	225	75
6S	***M. piperita*** **Yakima**	300	100
7S	***M. piperita*** **Basilicuminze**	240	80
8S	***M. piperita*** **Black mitcham**	270	90
9S	***M. dumetorum***	300	100
10S	***M. piperita*** **Granada**	300	100
11S	***M. arvensis***	270	90

Tablo 4.3: Ekstresi alınan katı kalıntı miktarları

Grup	*Mentha* Türleri	Katı Atık (gr)	Pres Sonrası Kullanılan Miktar (gr)
1B	***M. piperita*** **Piper-1**	50	10
2B	***M. piperita*** **Chocolate**	50	10
3B	***M. piperita*** **Citaro**	55	11
4B	***M. piperita*** **Multimentha**	55	11
5B	***M. piperita*** **Swiss**	50	10
6B	***M. piperita*** **Yakima**	50	10
7B	***M. piperita*** **Basilicuminze**	45	9
8B	***M. piperita*** **Black mitcham**	55	11
9B	***M. dumetorum***	50	10
10B	***M. piperita*** **Granada**	50	10
11B	***M. arvensis***	50	10

Tablo 4.4: *Mentha* ekstre grupları verim yüzdeleri

Mentha Türleri	A (gr)	Verim (%)	B (gr)	Verim (%)	S (gr)	Verim (%)
***M. piperita* Piper-1**	0,95	19	0,27	6	1,91	27
***M. piperita* 'Chocolate'**	1,02	20	0,22	5,5	1,75	25
***M. piperita* 'Citaro'**	1,07	21	0,23	5,75	1,98	28
***M. piperita* 'Multimentha'**	**0,97**	19	0,25	6	1,83	26
***M. piperita* 'Swiss'**	0,92	18	0,22	5,5	1,53	21
***M. piperita* 'Yakima'**	0,85	17	0,14	3,5	1,75	25
***M. piperita* 'Basilicuminze'**	0,85	17	0,19	4,75	1,43	20
***M. piperita* 'Black mitcham'**	1,04	21	0,22	5,5	2,03	29
M. dumetorum	1,10	22	0,22	5,5	2,54	36
***M. piperita* 'Granada'**	1,08	21	0,23	5,5	2,11	30
M. arvensis	0,95	19	0,17	4,25	1,48	21

4.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR

Her bitki ekstresi ve standart için 1 mg/mL stok çözeltiler hazırlandı. Standart bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerle kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Böylece, ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik miktarları kantitatif olarak belirlendi. Kalibrasyon sürecinde 16 farklı fenolik bileşik çalışıldı, bunlar; 4-Hidroksibenzoik asit, rutin, kuersetin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kikorik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, vanilik asit, apigenin-7-O- glikozit, salisilik asit, epikateşin, naringenin ve eriositrin. Her bir fenolik bileşik, maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (nm) değerlendirilerek kantitatif hesplamalar yapıldı. Her ekstre yöntemi ve 11 farklı nane çeşiti için değerlendirilen fenolik bileşiklerden bazıları HPLC'de dedekte edilemedi ve bunlar değerlendirmelerden çıkarıldı. Bunlar; 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, epikateşin, salisilik asit, sinamik asit.

4.2.1. *Mentha* Türlerinden Hazırlanan Etanol/Su Ekstrelerinin Fenolik Bileşik Bulguları

Mentha türlerinden %70 etanol çözeltisi ile hazırlanan ekstrelerin (A) HPLC metodu ile tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarları Tablo 4.5 'de verilmiştir.

Tablo 4.5: Sulu/etanol ekstrelerinin fenolik bileşik içerikleri

(mg /g ekstre)	Gallik Asit	Klorojenik Asit	Kafeik Asit	p-kumarik Asit	Ferulik Asit	Rutin	Rozmarinik Asit	Apigenin-7-glukozit	Kuersetin	Naringenin	Eriositrin	Toplam
M. piperita Piper-1	0,008	1,121	0	0	0,046	32,527	122,393	0,93	0,381	0,059	544,394	701,859
M. piperita Chocolate	0,042	3,36	0,053	0	0	19,352	81,523	0,782	0,1	0,043	517,494	622,749
M. piperita Citaro	0,094	2,091	0,034	0	0,096	27,323	125,724	0,85	0,099	0,257	796,843	953,411
M. piperita Multimentha	0,081	1,303	0,052	0	0,059	26,616	102,009	1,912	0,151	0,289	231,151	363,623
M. piperita Swiss	0,126	1,471	0	0,681	0,056	50,808	160,773	3,036	0,278	0,438	643,829	861,496
M. piperita Yakima	0,114	1,463	0,042	0,549	0,052	40,804	187,516	2,57	0,477	0,291	416,081	649,959
M. piperita Basilicuminze	0,186	3,071	0	0,077	0,151	40,976	253,776	1,694	0,854	0,277	263,658	564,72
M. piperita Black mitcham	0,075	1,601	0,076	0	0,112	43,785	73,311	1,076	0,464	0,212	821,827	942,539
M. dumetorum Dume-1	0,192	1,23	0,155	0	0,099	26,671	132,585	1,292	0,084	1,304	449,992	613,604
M. piperita Granada	0,093	4,418	0,323	0	0,062	26,789	211,562	1,839	0	0,909	497,392	743,387
M. arvensis Arven-1	0,063	1,414	2,213	0,287	0,052	0	35,359	0	0	3,349	4,595	47,332

4.2.2. Distilasyon Sonrası Nane Çeşitlerin Katı Atık Ekstrelerinin Fenolik Bileşik Sonuçları

Mentha türlerinin uçucu yağ eldesi sonrası kalıntı katı atıkların %70 etanol çözeltisi ile hazırlanan ekstrelerinin (B) HPLC sonuçları Tablo 4.6 'da verilmiştir.

Tablo 4.6: Katı kalıntı ekstrelerinin fenolik bileşik içerikleri

(mg /g ekstre)	Gallik Asit	Klorojenik Asit	Kafeik Asit	p-kumarik Asit	Ferulik Asit	Rutin	Rozmarinik Asit	Apigenin-7-glukozit	Kuersetin	Naringenin	Eriositrin	Toplam
M. piperita Piper-1	0,585	2,532	0,121	0	0	26,803	53,732	0,956	2,348	0,753	319,464	407,294
M. piperita Chocolate	0,437	2,004	0	0,113	0	17,384	73,075	0,728	1,088	0,573	311,499	406,901
M. piperita Citaro	0,527	1,874	0,111	0	0	21,331	77,842	0,664	0,723	0,931	509,761	613,764
M. piperita Multimentha	0,696	2,655	0,1	0,06	0	32,281	96,6	1,401	1,033	1,062	216,319	352,207
M. piperita Swiss	0,39	1,375	0	0,146	0	25,849	77,132	1,349	0,585	0,971	283,249	391,046
M. piperita Yakima	0,856	3,334	0,184	0,204	0,128	34,472	105,408	2,069	2,638	2,305	261,556	413,154
M. piperita Basilicuminze	0,415	2,926	0	0,032	0	23,336	142,772	1,235	2,495	0,89	117,007	291,108
M. piperita Black Mitcham	0,215	1,078	0	0	0,082	19,595	44,123	0,539	1,231	0,909	336,233	404,005
M. dumetorum Dume-1	1,475	1,365	0,027	0	0,168	22,91	114,913	1,278	3,528	7,151	298,155	450,97
M. piperita Granada	0,422	2,446	0,259	0	0	31,022	298,717	2,229	4,954	5,445	459,059	804,553
M. arvensis Arven-1	0,337	2,092	0	0	0	0,876	29,421	0,198	2,288	9,981	5,456	50,649

4.2.3. Distilasyon Sonrası Nane Çeşitlerinin Atık Su Ekstrelerinin Fenolik Bileşik Sonuçları

Mentha Türlerinden uçucu yağ eldesi sonrasında atık su ekstrelerinin (S) HPLC analizleri Tablo 4.7 de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Atık su ekstrelerinin fenolik bileşik sonuçları

(mg /g ekstre)	Gallik Asit	Klorojenik Asit	Kafeik Asit	p-kumarik Asit	Ferulik Asit	Rutin	Rozmarinik Asit	Apigenin-7-glukozit	Kuersetin	Naringenin	Eriositrin	Toplam
M. piperita Piper-1	0,01	3,059	0	0	0	12,958	43,784	0,478	0,059	0	320,597	380,945
M. piperita Chocolate	1,033	3,134	0	0	0	8,653	70,338	0,398	0,056	0,057	381,414	465,083
M. piperita Citaro	0,811	2,231	0	0	0,065	11,515	60,656	0,438	0,041	0,068	517,591	593,416
M. piperita Multimentha	0,879	2,308	0	0	0	10,494	52,404	0,537	0,066	0	166,825	233,513
M. piperita Swiss	0,811	1,957	0	0	0,035	17,628	77,692	1,163	0,14	0,218	396,974	496,618
M. piperita Yakima	1,312	3,161	0	0,358	0,105	13,57	75,71		0,254	0,129	235,34	329,939
M. piperita Basilicuminze	0,626	3,193	0	0,044	0,156	9,758	107,517	0,594	0,103	0,152	111,984	234,127
M. piperita Black mitcham	0,465	1,677	0	0	0,106	7,86	32,838	0,305	0,54	0,065	425,263	469,119
M. dumetorum Dume-1	2,371	1,251	0,046	0	0,159	12,922	79,594	0,752	0,196	0,584	280,261	378,136
M. piperita Granada	0,439	1,623	0,161	0	0	11,174	193,747	0,982	0,066	0,38	325,252	533,824
M. arvensis Arven-1	0,578	2,172	0	0,272	0	0	16,161	0,258	0,06	0,116	0,661	20,278

4.2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri ve Fenolik Bileşiklerin, *Mentha* Türlerininde ki Farklılıkların Kıyaslanması

Mentha türleri üzerinde üç farklı ekstraksiyon yöntemi ve 11 farklı fenolik bileşik içeriği ile ilgili ileri istatistiksel araştırmalar yapılmıştır. Mentha türlerinin ekstraksiyon metotları ile toplam fenolik bileşikleri istatistiksel olarak farklılıkları İki yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak incelenmiştir, farklı ekstraksiyon yöntemlerinde fenolik bileşik içerikleri açısından anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu sonuçlar Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Detaylandırmak için post-hoc testlerden Tukey'in çoklu karşılaştırmalar testi yapılmıştır ve Tablo 4.9' da sonuçlar gösterilmiştir.

Tablo 4.8: *Mentha* türlerinin ekstraksiyon yöntemlerinin ve fenolik bileşik miktarlarının iki yönlü anova analizi

Tablo Analizi	A-B-S *Mentha* Ekstraksiyon Metotları		
İki Yönlü ANOVA	Eşleştirme		
Küresellik Varsayımı	Evet		
Alfa	0,05		
			Önemi
Değişimin Kaynağı	Toplam varyasyonun %'si	P değeri	Özet
Metot A-B-S	0,8105	<0,0001 ****	Evet

3 Metot Değerlendirmesi

Tablo 4.9: *Mentha* türlerinin, ekstraksiyon yöntemlerinin ve fenolik bileşik miktarlarının tukey'in çoklu karşılaştırmalı test analizi

Familya Sayısı	1
Familya Başına Karşılaştırma Sayısı	3
Alfa	0,05

Tukey'in Çoklu Karşılaştıma Analizi	Ortalama Fark	95,00% Ortalama Farkın CI'sı	Önemi	Özet	Düzeltilmiş Değer	P
A vs. B	20,49	0,5527 to 40,42	Yes	*	0,043	A-B
A vs. S	24,21	4,277 to 44,15	Yes	*	0,0147	A-S
B vs. S	3,724	-16,21 to 23,66	No	ns	0,8901	B-S

4.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE BULGULARI

4.3.1. 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•$^{+}$) Radikali Giderme Aktivite Bulguları

Konsantrasyon aralığı 1 mg/mL ile 125 µg/mL olarak hazırlanan Trolox bileşiğinin, ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktivitesinin yüzde inhibisyon grafiği kullanılarak IC50 değeri hesaplandı. Trolox'un IC50 değeri 4,649±0,24 µg/mL olarak hesaplandı. Farklı *Mentha* türlerinin her bir ekstresinin farklı konsantrasyonlarda ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri analiz edilip IC50 değerleri hesaplandı. Sonuclar Trolox bileşiği ile karşılaştırıldı. A grubunda 3,66±0,16 µg/mL IC50 değeri ile *M. piperita* 'Yakima', B grubunda *M. piperita* 'Citaro' 4,056±0,45 ve *M. piperita* 'Swiss' 4,13±0,67 IC50 değerleri ile Trolox Bileşiğinden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Mentha türlerinin etanol ekstresi (A), ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri methodu kullanılarak IC50 değerleri hesaplanarak verilmiştir.

Tablo 4.10'da da görüldüğü gibi A grubu olarak belirttiğimiz etanol/su ekstrelerinin ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktivitesi *M. piperita* 'Yakima' ve *M. piperita* 'Granada' çeşitleride ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktiviteleri Troloks bileşiğinden daha yüksek aktivte gösterirken en düşük aktiviteyi *M. piperita* 'Chocolate' çeşitinde gözlemlenmiştir. Türler arasındaki karşılaştırmaya bakıldığında *M. piperita* kultivarlardan *M. piperita* 'Black mitcham' ve *M. piperita* 'Chocolate' çeşitleri hariç diğer çeşitlerin ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktiviteleri *M. dumetorum* Dume-1 ve *M. arvensis* Arven-1 çeşitlerinden daha yüksek bir aktivite gözlemlenmiştir Tablo 4.10'da *Mentha* türlerinin ABTS•$^{+}$ metodu IC50 (µg/mL) değerleri verilmiştir.

Tablo 4.10: *Mentha* türlerinin etanol/su ekstrelerininsi aktivite bulguları (A), ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktiviteleri

ABTS•$^{+}$	*Mentha* Türleri	IC50 (µg/mL)
1A	*M. piperita* Piper-1	7,46±0,94
2A	*M. piperita* 'Chocolate'	10,95±1,54
3A	*M. piperita* 'Citaro'	8,36±1,14
4A	*M. piperita* 'Multimentha'	6,72±0,61
5A	*M. piperita* 'Swiss'	6,73±0,82
6A	*M. piperita* 'Yakima'	3,66±0,16
7A	*M. piperita* 'Basilicuminze'	7,35±0,78
8A	*M. piperita* 'Black mitcham'	10,27±1,04
9A	*M. dumetorum* Dume-1	8,19±0,83
10A	*M. piperita* 'Granada'	5,24±0,36
11A	*M. arvensis* Arven-1	8,06±0,62
	TROLOX	4,64±0,24

Mentha türlerinin katı kalıntı etanol ekstresi (B), ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri IC50 değerleri hesaplanarak verilmiştir.

Tablo 4. 11'de de görüldüğü gibi B grubu olarak belirttiğimiz katı kalıntı etanol/su ekstrelerinin ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktivitesi *M. piperita* 'Swiss' *ve M. piperita* 'Citaro' çeşitleride ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktiviteleri Troloks bileşiğinden daha yüksek aktivte gösterirken en düşük aktiviteyi M. arvensis çeşitinde gözlemlenmiştir.

Tablo 4.11: Katı kalıntı etanol/su ekstrelerinin (B), ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktivite bulguları

ABTS•$^{+}$	*Mentha* Türleri	IC_{50} (µg/mL)
1B	*M. piperita* Piper-1	7,36±0,92
2B	*M. piperita* 'Chocolate'	8,51±1,23
3B	*M. piperita* 'Citaro'	4,056±0,45
4B	*M. piperita* 'Multimentha'	4,92±0,53
5B	*M. piperita* 'Swiss'	4,13±0,67
6B	*M. piperita* 'Yakima'	6,37±0,95
7B	*M. piperita* 'Basilicuminze'	6,19±0,73
8B	*M. piperita* 'Black mitcham'	4,87±0,32
9B	*M. dumetorum* Dume-1	5,75±0,55
10B	*M. piperita* 'Granada'	7,08±1,02
11B	*M. arvensis* Arven-1	9,76±1,24
.	TROLOX	4,649±0,24

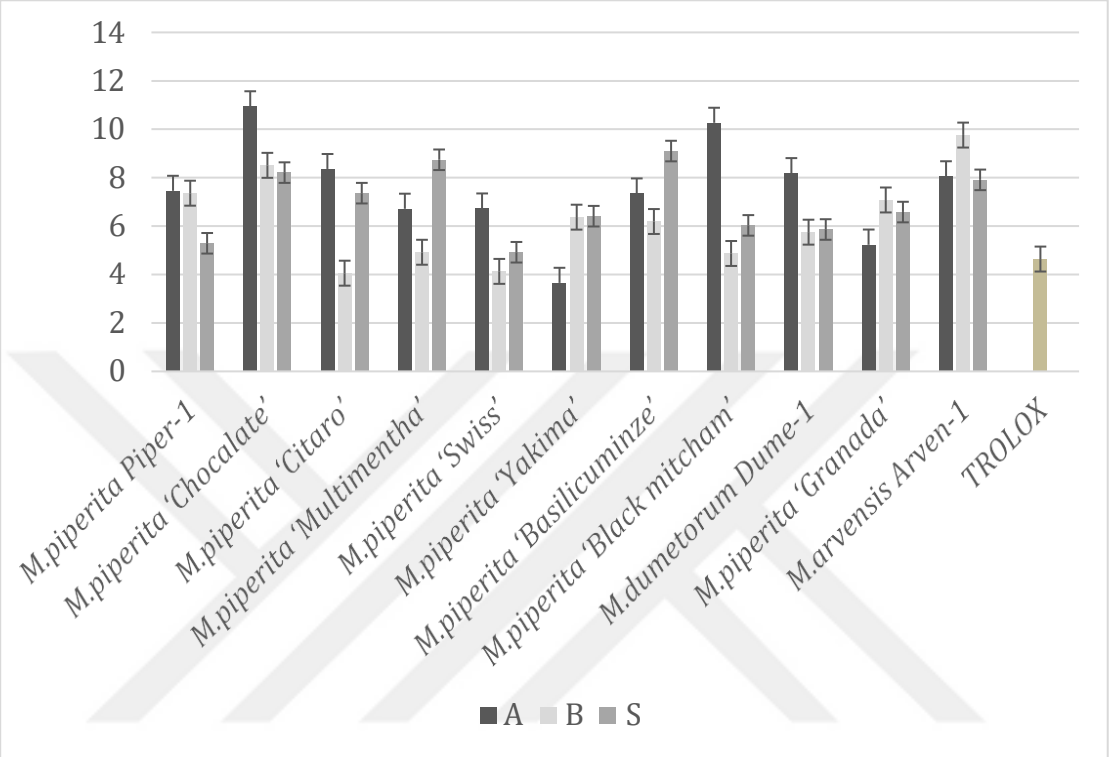
Mentha türlerinin atık su ekstresi (S), ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri IC_{50} değerleri hesaplanarak verilmiştir.

Tablo 4.12'de de görüldüğü gibi S grubu olarak belirttiğimiz atık su ekstrelerinden ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktivitesi Troloks bileşiğinden daha yüksek aktivte gösteriren nane türü yoktur en yüksek aktiviteyi *M. piperita* 'Swiss' ve *M. piperita* Piper-1 türlerinde gözlemlenmiştir. En düşük aktivite *M. piperita* 'Basilicuminze' çeşitinde gözlemlenmiştir.

Tablo 4.12: Atık su ekstrelerinin (S), ABTS•$^{+}$ radikal giderme aktivite bulguları

ABTS•$^{+}$	*Mentha* Türleri	IC_{50} (µg/mL)
1S	*M. piperita* Piper-1	5,294±0,41
2S	*M. piperita* 'Chocolate'	8,215±0,66
3S	*M. piperita* 'Citaro'	7,362±0,72
4S	*M. piperita* 'Multimentha'	8,749±0,64
5S	*M. piperita* 'Swiss'	4,927±0,45
6S	*M. piperita* 'Yakima'	6,417±0,80
7S	*M. piperita* 'Basilicuminze'	9,108±0,68
8S	*M. piperita* 'Black mitcham'	6,038±0,42
9S	*M. dumetorum* Dume-1	5,862±0,36
10S	*M. piperita* 'Granada'	6,584±0,38
11S	*M. arvensis* Arven-1	7,918±0,86
.	TROLOX	4,649±0,24

Farklı *Mentha* ekstrelerinin (A, B, S) ABTS•$^{+}$ IC_{50} değerleri Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Mentha* ekstrelerinin ABTS•$^{+}$ IC_{50} değerleri

4.3.2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) Radikali Giderme Aktivite Bulguları

Konsantrasyon aralığı 10 ile 250 µg/mL arasında hazırlanan Trolox bileşiğinin DPPH• radikal giderme aktivitesinin yüzde inhibisyon grafiği kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı. *Mentha* türlerinin her bir ekstresinin farklı konsantrasyonlarda DPPH• radikali giderme aktiviteleri analiz edilip IC_{50} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Trolox bileşiği ile karşılaştırıldı. Trolox standardının IC_{50} değeri 6,153±1,15 µg/mL olarak hesaplanırken, A grubu ekstrenin, distilasyon sonrası katı kalıntı materyalin B grubu ekstreleri ve atık su ekstreleri (S grubu) için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her ekstre grubundaki *Mentha* türlerinin tamamı, Trolox'tan daha düşük antioksidan aktivite göstermiştir. *Mentha x piperita* 'Granada' hariç tüm *Mentha*

x piperita çeşitleri, A ve B gruplarında yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. S grubunda ise antioksidan aktivite düzeyi düşük saptanmıştır.

Mentha türlerinin etanol ekstresi (A), DPPH• radikal giderme aktiviteleri IC_{50} değerleri hesaplanarak Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13'te de görüldüğü gibi A grubu olarak belirttiğimiz etanol/su ekstrelerinin DPPH• radikal giderme aktivitesi *M. piperita* 'Yakima' ve *M. piperita* 'Swiss' çeşitleride DPPH• radikal giderme aktiviteleri çeşitler içerisinde en yüksek aktivte gösterirken en düşük aktiviteyi *M. dumetorum* Dume-1 ve *M. arvensis* Arven-1 çeşitlerinde gözlemlenmiştir. Ancak tüm çeşitlerin DPPH• radikal giderme aktiviteleri Troloks ile karşılaştırıldığında daha düşük aktivite gösterdikleri görülmüştür.

Tablo 4.13: *Mentha* türlerinin etanol/su ekstrelerinin (A), DPPH• radikal giderme aktivite bulguları

DPPH•	*Mentha* Türleri	IC_{50} (µg/mL)
1A	*M. piperita* Piper-*1*	12,43±3,24
2A	*M. piperita* 'Chocolate'	13,08±4,13
3A	*M. piperita* 'Citaro'	12,25±1,24
4A	*M. piperita* 'Multimentha'	12,68±2,54
5A	*M. piperita* 'Swiss'	12,09±4,14
6A	*M. piperita* 'Yakima'	12,17±3,43
7A	*M. piperita* 'Basilicuminze'	13,31±0,94
8A	*M. piperita* 'Black mitcham'	13,3±1,15
9A	*M. dumetorum* Dume-1	21,65±7,22
10A	*M. piperita* 'Granada'	35,56±4,46
11A	*M. arvensis* Arven-1	66,86±9,14
.	TROLOX	6,153±1,15

Tablo 4.14'te de görüldüğü gibi B grubu olarak belirttiğimiz katı kalıntı etanol/su ekstrelerinin DPPH• radikal giderme aktivitesi *M. piperita* 'Yakima' *ve M. piperita* 'Basilicuminze' çeşitleride DPPH• radikal giderme aktiviteleri çeşitler içerisinde en yüksek aktivte gösterirken en düşük aktiviteyi *M. dumetorum* Dume-1 ve *M. arvensis* Arven-1 çeşitlerinde gözlemlenmiştir. Ancak tüm çeşitlerin DPPH•

radikal giderme aktiviteleri Troloks ile karşılaştırıldığında daha düşük aktivite gösterdikleri görülmüştür.

Tablo 4.14: Katı kalıntı etanol/su ekstrelerininsi (B), DPPH• radikal giderme aktivite bulguları

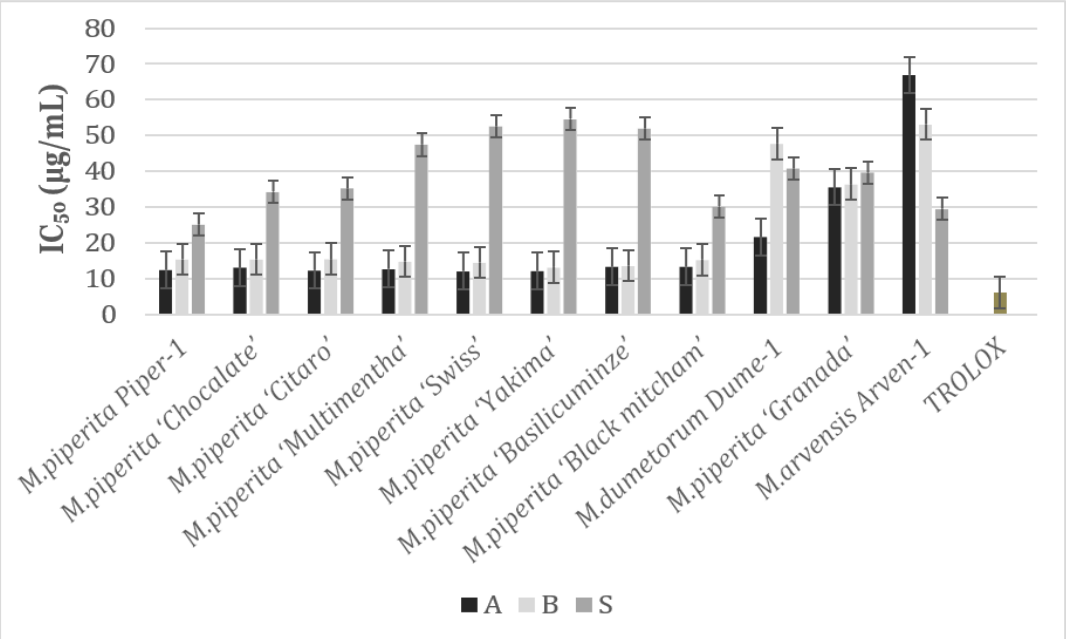
DPPH•	*Mentha* Türleri	IC_{50} (µg/mL)
1B	***M. piperita* Piper-1**	**15,4±2,45**
2B	***M. piperita* 'Chocolate'**	**15,4±2,14**
3B	***M. piperita* 'Citaro'**	**15,5±2,11**
4B	***M. piperita* 'Multimentha'**	**14,8±1,16**
5B	***M. piperita* 'Swiss'**	**14,5±1,14**
6B	***M. piperita* 'Yakima'**	**13,1±1,18**
7B	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**13,6±1,43**
8B	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**15,2±2,15**
9B	***M. dumetorum* Dume-1**	**47,7±6,18**
10B	***M. piperita* 'Granada'**	**36,4±4,67**
11B	***M. arvensis* Arven-1**	**53,1±8,07**
.	**TROLOX**	**6,15±1,15**

Mentha türlerinin atık su ekstresi (S), DPPH• radikal giderme aktiviteleri IC_{50} şeklinde hesaplanarak Tablo 4.15'te verilmiştir Tablo 4.15'te de görüldüğü gibi S grubu olarak belirttiğimiz atık su ekstrelerinin DPPH• radikal giderme aktivitesi *M. piperita* Piper-1 DPPH• radikal giderme aktiviteleri çeşitler içerisinde en yüksek aktivite gösterirken en düşük aktiviteyi *M. piperita* 'Yakima' çeşitinde gözlemlenmiştir. Ancak tüm çeşitlerin DPPH• radikal giderme aktiviteleri Troloks ile karşılaştırıldığında daha düşük aktivite gösterdikleri görülmüştür.

Tablo 4.15: Atık su ekstrelerinin DPPH• radikal giderme aktivite bulguları

DPPH•	*Mentha* Türleri	IC_{50} (µg/mL)
1S	***M. piperita* Piper-1**	**25,1±3,23**
2S	***M. piperita* 'Chocolate'**	**34,2±6,22**
3S	***M. piperita* 'Citaro'**	**35,2±3,57**
4S	***M. piperita* 'Multimentha'**	**47,4±2,12**
5S	***M. piperita* 'Swiss'**	**52,5±4,63**
6S	***M. piperita* 'Yakima'**	**54,5±8,12**
7S	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**51,9±5,54**
8S	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**30,1±7,11**
9S	***M. dumetorum* Dume-1**	**40,8±2,65**
10S	***M. piperita* 'Granada'**	**39,6±6,22**
11S	***M. arvensis* Arven-1**	**29,4±5,34**
.	**TROLOX**	**6,15±1,15**

Farklı *Mentha* ekstrelerinin (A, B, S) DPPH• IC_{50} değerleri Şekil 4.2' de verilmiştir.

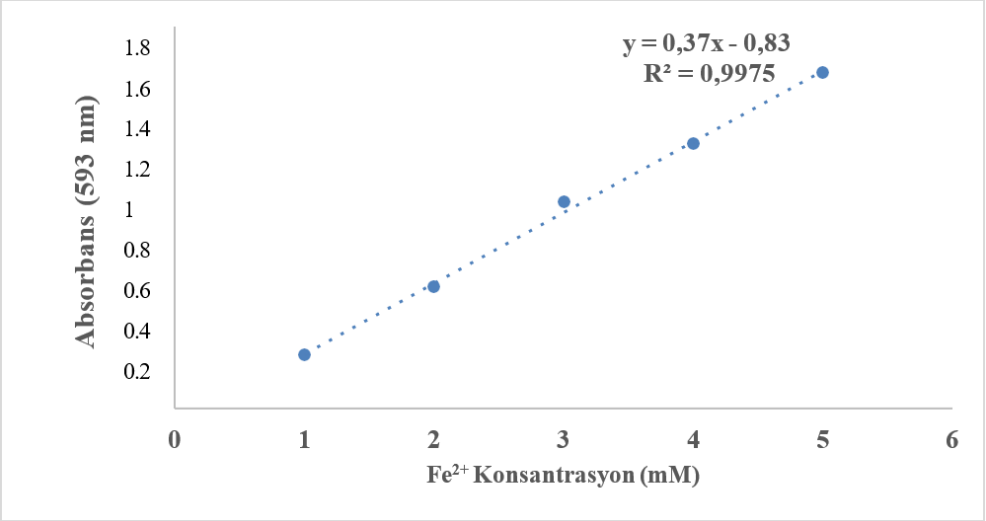


Şekil 4.2: *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) DPPH• radikal giderme aktivite bulguları

4.3.3. Demir (III) İyonu İndirgeyici Gücü Antioksidan Aktivite (FRAP) Bulguları

Demir (III) iyonu indirgeme kapasitesini olcen bu deneyde hesaplamalarda kullanılan $FeSO_4$ bileşiğinin 1-5 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış, absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi grafiği cizilmiştir (Şekil 4.3). Bu eğriye göre hesaplanan sonuclar mmol Fe^{2+}/g ekstre olarak verilmiştir. *Mentha* türlerinin farklı yollar ile elde edilen ekstrelerinin FRAP antioksidan aktivite tayinin yapılmış.

Tablo 4.16' da gösterildiği üzere %70 Etanol/su çözeltisi ile hazırlanmış *Mentha* ekstrelerinden (A) *M. piperita* 'Swiss' 1,62±0,009 mmol Fe^{2+}/g ekstre ve *M. piperita* 'Yakima' 1,79±0,013 mmol Fe^{2+}/g ekstre en yüksek antioksidan aktivite gösteren *Mentha* türleri olmuştur. Distilasyon sonrası katı kalıntı materyalinden %70'lik etanol/su ekstresi (B)'nde ise *M. piperita* 'Yakima' 1,59±0,011 mmol Fe^{2+}/g ekstre ve *M. dumetorum* Dume-1 1,70±0,007 mmol Fe^{2+}/g ekstre değerleri ile en yüksek antioksidan aktivite gösteren *Mentha* türleri olmuştur (Tablo 4.17). Atık su ekstresin de *M. piperita* 'Yakima' 1,59±0,011 mmol Fe^{2+}/g ekstre ve *M. dumetorum* Dume-1 1,70±0,007 mmol Fe^{2+}/g ekstre değerleri ile en yüksek antioksidan aktivite gösteren *Mentha* türleri olmuştur (Tablo 4.18). Şekil 4.4 'de *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) FRAP mmol Fe^{2+}/g ekstre değerleri verilmiştir. *M. piperita* 'Yakima' her ekstre grubunda da yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.



Şekil 4.3: Fe^{2+} – Absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği

Mentha türlerinin etanol ekstresi (A), FRAP ferrik demir (Fe^{3+}) indirgeme gücü Fe^{2+} kalibrasyon denklemi kullanılarak sonuçlar mmol Fe^{2+}/g ekstre şeklinde verilmiştir Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16: *Mentha* çeşitlerinin etanol/su ekstresinin FRAP bulguları

FRAP	*Mentha* Türleri	Mmol Fe^{2+}/g ekstre
1A	***M. piperita* Piper-1**	**1,58±0,023**
2A	***M. piperita* 'Chocolate'**	**0,71±0,002**
3A	***M. piperita* 'Citaro'**	**1,30±0,011**
4A	***M. piperita* 'Multimentha'**	**1,10±0,012**
5A	***M. piperita* 'Swiss'**	**1,62±0,009**
6A	***M. piperita* 'Yakima'**	**1,79±0,013**
7A	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**1,43±0,004**
8A	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**0,86±0,006**
9A	***M. dumetorum* Dume-1**	**1,20±0,013**
10A	***M. piperita* 'Granada'**	**1,42±0,005**
11A	***M. arvensis* Arven-1**	**0,58±0,003**

Katı kalıntı etanol ekstresi (B), FRAP ferrik demir (Fe3+) indirgeme gücü, Fe2+ kalibrasyon denklemi kullanılarak sonuçlar mmol Fe2+/g ekstre şeklinde verilmiştir Tablo 4.17' de verilmiştir.

Tablo 4.17: Katı kalıntı etanol ekstresinin FRAP bulguları

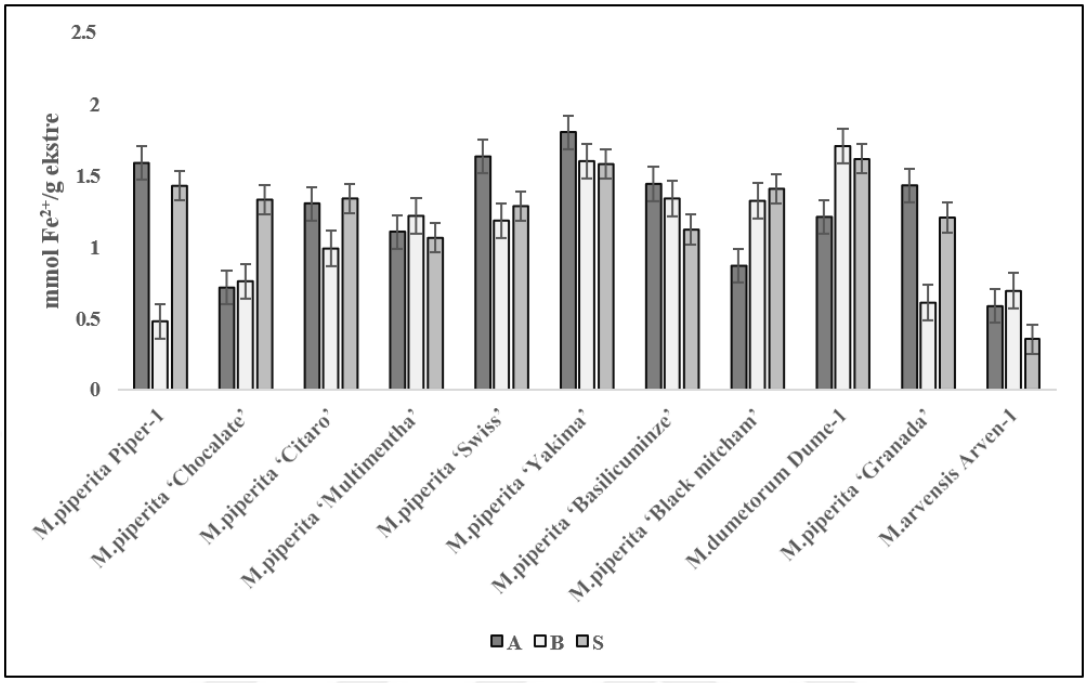
FRAP	*Mentha* Türleri	Mmol Fe^{2+}/g ekstre
1B	***M. piperita* Piper-1**	**0,47±0,005**
2B	***M. piperita* 'Chocolate'**	**0,75±0,003**
3B	***M. piperita* 'Citaro'**	**0,98±0,012**
4B	***M. piperita* 'Multimentha'**	**1,21±0,015**
5B	***M. piperita* 'Swiss'**	**1,18±0,016**
6B	***M. piperita* 'Yakima'**	**1,59±0,011**
7B	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**1,33±0,018**
8B	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**1,31±0,003**
9B	***M. dumetorum* Dume-1**	**1,70±0,007**
10B	***M. piperita* 'Granada'**	**0,60±0,005**
11B	***M. arvensis* Arven-1**	**0,69±0,008**

Mentha türlerinin atık su ekstreleri (S), FRAP ferrik demir (Fe^{3+}) indirgeme gücü, Fe^{2+} kalibrasyon denklemi kullanılarak sonuçlar mmol Fe^{2+}/g ekstre şeklinde Tablo 4.18 'de verilmiştir.

Tablo 4.18: Atık su ekstresinin FRAP Bulguları

FRAP	*Mentha* Türleri	Mmol Fe^{2+}/g ekstre
1S	***M. piperita* Piper-1**	**1,42±0,012**
2S	***M. piperita* 'Chocolate'**	**1,33±0,014**
3S	***M. piperita* 'Citaro'**	**1,33±0,016**
4S	***M. piperita* 'Multimentha'**	**1,06±0,008**
5S	***M. piperita* 'Swiss'**	**1,28±0,011**
6S	***M. piperita* 'Yakima'**	**1,57±0,008**
7S	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**1,11±0,012**
8S	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**1,40±0,013**
9S	***M. dumetorum* Dume-1**	**1,61±0,014**
10S	***M. piperita* 'Granada'**	**1,20±0,015**
11S	***M. arvensis* Arven-1**	**0,35±0,004**

Mentha ekstre grupları (A, B, S) FRAP mmol Fe2+/g ekstre değerleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) frap mmol Fe^{2+}/g ekstre değerleri

4.3.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Bulguları

Mentha türlerinin farklı yöntemlerle elde edilen ekstrelerinin CUPRAC antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Bakır (II) iyonu indirgeme kapasitesini ölçmek için kullanılan Trolox bileşiğinin 0,05-0,7 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.5). Bu eğriye göre hesaplanan sonuçlar mmol TEAC/g ekstre olarak verilmiştir. %70 etanol ile hazırlanmış *Mentha* ekstrelerinden (A grubu) (Tablo 4.19) *M. piperita* 'Swiss' 0,60±0,011 mmol TEAC/g ekstre ve *M. piperita* 'Citaro' 0,77±0,005 mmol TEAC/g ekstre ile en yüksek CUPRAC aktivite gösteren *Mentha* türleri olmuştur. Distilasyon sonrası katı kalıntı materyalin %70 etanol ekstresinde (B grubu) (Tablo 4.20) ise yüksek antioksidan aktivite gösteren bir *Mentha* türü bulunmamaktadır. Sıvı kalıntı ekstresinde ise, *M. piperita* 'Granada' 1,37±0,016 mmol TEAC/g ekstre değeri ile en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren *Mentha* türü olmuştur. S grubunda (Tablo 4.21) yer alan *Mentha* türleri, diğer ekstre çeşitlerine göre anlamlı bir şekilde daha yüksek CUPRAC aktivite göstermiştir.



Şekil 4.5: Trolox absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği

Mentha türlerinin etanol ekstresi (A), CUPRAC Bakır (II) iyonu indirgeme kapasitesini Trolox absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği kullanılarak sonuçlar mmol TEAC/g ekstre şeklinde verilmiştir Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4.19: *Mentha* çeşitlerinin etanol ekstresinin CUPRAC bulguları

CUPRAC	*Mentha* Türleri	Mmol TEAC/g ekstre
1A	***M. piperita* Piper-1**	**0,23±0,002**
2A	***M. piperita* 'Chocolate'**	**0,42±0,004**
3A	***M. piperita* 'Citaro'**	**0,77±0,005**
4A	***M. piperita* 'Multimentha'**	**0,39±0,006**
5A	***M. piperita* 'Swiss'**	**0,60±0,011**
6A	***M. piperita* 'Yakima'**	**0,63±0,003**
7A	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**0,29±0,002**
8A	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**0,35±0,004**
9A	***M. dumetorum* Dume-1**	**0,35±0,008**
10A	***M. piperita* 'Granada'**	**0,23±0,006**
11A	***M. arvensis* Arven-1**	**0,19±0,005**

Mentha türlerinin katı kalıntı etanol ekstresi (B), CUPRAC Bakır (II) iyonu indirgeme kapasitesini Trolox absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği kullanılarak sonuçlar mmol TEAC/g ekstre şeklinde verilmiştir Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.20: Katı kalıntı etanol ekstrelerinin CUPRAC bulguları

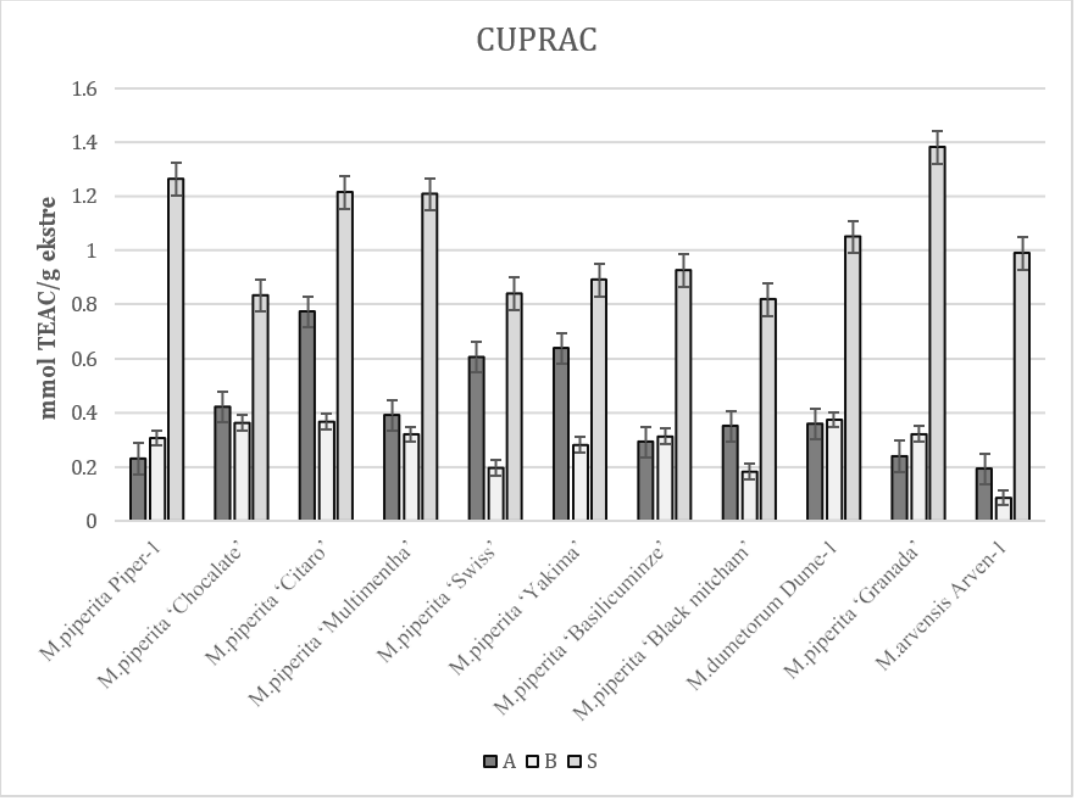
CUPRAC	*Mentha* Türleri	Mmol TEAC/g ekstre
1B	***M. piperita* Piper-1**	**0,30±0,005**
2B	***M. piperita* 'Chocolate'**	**0,36±0,004**
3B	***M. piperita* 'Citaro'**	**0,36±0,002**
4B	***M. piperita* 'Multimentha'**	**0,32±0,008**
5B	***M. piperita* 'Swiss'**	**0,19±0,001**
6B	***M. piperita* 'Yakima'**	**0,28±0,006**
7B	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**0,31±0,003**
8B	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**0,18±0,002**
9B	***M. dumetorum* Dume-1**	**0,37±0,011**
10B	***M. piperita* 'Granada'**	**0,32±0,008**
11B	***M. arvensis* Arven-1**	**0,08±0,001**

Mentha türlerinin atık su ekstresi (S), CUPRAC Bakır (II) iyonu indirgeme kapasitesini Trolox absorbans kalibrasyon eğrisi grafiği kullanılarak sonuçlar mmol TEAC/g ekstre şeklinde verilmiştir Tablo 4.21'de verilmiştir.

Tablo 4.21: Atık su ekstrelerinin CUPRAC bulguları

CUPRAC	*Mentha* Türleri	mmol TEAC/g ekstre
1S	***M. piperita* Piper-1**	**1,26±0,012**
2S	***M. piperita* 'Chocolate'**	**0,83±0,005**
3S	***M. piperita* 'Citaro'**	**1,21±0,009**
4S	***M. piperita* 'Multimentha'**	**1,20±0,011**
5S	***M. piperita* 'Swiss'**	**0,83±0,008**
6S	***M. piperita* 'Yakima'**	**0,89±0,006**
7S	***M. piperita* 'Basilicuminze'**	**0,92±0,013**
8S	***M. piperita* 'Black mitcham'**	**0,81±0,007**
9S	***M. dumetorum* Dume-1**	**1,04±0,014**
10S	***M. piperita* 'Granada'**	**1,37±0,016**
11S	***M. arvensis* Arven-1**	**0,98±0,010**

Mentha ekstre grupları (A, B, S) CUPRAC mmol TEAC/g ekstre değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6: *Mentha* ekstre grupları (A, B, S) CUPRAC bulguları

4.4. *MENTHA* VE KALINTI EKSTRELERİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERLE KORELASYONU

Mentha çeşitleri ve kalıntı materyallerinin ekstraksiyonları farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi ile değerlendirilmiş ve farklı antioksidan aktiviteler göstermiştir. 11 farklı *Mentha* çeşidinin antioksidan aktivitelerinin ölçülmesi için 4 farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi kullanılmıştır. ABTS•+ ve DPPH• yöntemlerinde IC_{50} değerleri bulunup kıyaslanmıştır. FRAP ve CUPRAC yöntemlerinde ise absorbans değerleri standartlarla mukayese edilip ekivalanları hesaplanarak kıyaslanmıştır. *Mentha* türlerinin Fenolik bileşikleri, HPLC yöntemi ile değerlendirilmiş ve *Mentha* türlerinde pik veren rutin, kuersetin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, apigenin 7-glikozit, epikateşin, naringenin

ve eriositrin gibi bileşikler ile bu 4 farklı antioksidan aktivite yöntemleri arasındaki korelasyon Pearson R Korelasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

CUPRAC metodunda, hiçbir ekstre grubunda fenolik bileşikler arasında korelasyon bulunmamıştır. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri ile fenolik bileşikler arasında en çok korelasyon gösteren ekstre grubu *Mentha* türlerinin etanol ekstreleridir. A grubu ekstreleri, DPPH• metodunda kafeik asit, rutin, naringenin ve eriositrin ile yüksek korelasyon göstermiştir. ABTS•+ metodunda rosmarinik asit ve apigenin ile yüksek korelasyon bulunmuştur. FRAP metodunda ise rosmarinik asit, rutin ve apigenin ile yüksek korelasyon tespit edilmiştir. Tablo 4.22 'de tüm ekstre gruplarının fenolik bileşikleri ile antioksidan metodları arasındaki korelasyon mevcudiyeti gösterilmiştir. Yapılan Pearson R analiz sonuçlarından DPPH•-*Mentha* A grubu ekstrelerinin fenolik bileşikler ile korelasyonu EK-4 te gösterilmiştir.

Tablo 4.22: *Mentha* ekstre gruplarının ABTS•+, DPPH•. FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile fenolik bileşikler arasında korelasyonu tablosu

DPPH•-A IC_{50}	Kafeik Asit (+)	Rutin (−)	Naringenin (+)	Eriositrin (−)
DPPH•-B IC_{50}			Naringenin (+)	
DPPH•-S IC_{50}				
ABTS•+-A IC_{50}	Rosmarinik Asit (−)	Apigenin (−)		
ABTS•+-B IC_{50}				
ABTS•+-S IC_{50}				
FRAP-A	Rosmarinik Asit (+)	Rutin (+)	Apigenin (+)	
FRAP-B	Ferrulik Asit (+)			
FRAP-S		Rutin (+)		Eriositrin (+)
CUPRAC-A				
CUPRAC-B				
CUPRAC-S				

(−): Negatif Korelasyon (+): Pozitif Korelasyon

5. TARTIŞMA

Nane, tek bileşenli bitki çayları olarak en yaygın tüketilenlerinden biridir. Bitki yapraklarından demlenen nane çayı ve nane yağı geleneksel tıpta kullanılır. Bu bitkinin biyoaktivitesi hakkındaki kanıta dayalı araştırmalar incelenmektedir. Yaprakların fenolik bileşenleri arasında rosmarinik asit ve çeşitli flavonoidler, özellikle eriositrin, luteolin ve hesperidin bulunur. Uçucu yağın ana bileşenleri mentol ve mentondur. Nane, in vitro olarak önemli antimikrobiyal ve antiviral aktivitelere, güçlü antioksidan ve antitümör etkilere, ve bazı antialerjenik potansiyele sahiptir. Hayvan modeli çalışmaları, gastrointestinal (GI) dokuda rahatlama etkisi, merkezi ve periferik sinir sisteminde analjezik ve anestezik etkiler, immünomodülatör eylemler ve kemopreventif potansiyele işaret etmektedir. Nane yağı ve bileşenlerinin gastrointestinal, solunum yolu ve analjezik etkileri üzerine insan çalışmaları bildirilmiştir. İrritabl bağırsak sendromu (IBS) belirtileri üzerine nane yağının etkilerini inceleyen birkaç klinik çalışma yapılmıştır. Ancak nane ekstresi üzerine insan çalışmaları sınırlıdır ve nane çayı üzerine klinik çalışmalar yoktur. Nane çayına advers reaksiyonlar bildirilmemiş olmasına rağmen, nane yağı tedavisinde GI reflü, hiatal herni veya böbrek taşı olan hastalarda dikkatli olunması tavsiye edilmiştir (271).

Uçucu yağ talebi, eczacılık, kozmetik, hava temizleyiciler, losyonlar ve diğer ürünlerin üretiminde kullanılmasından dolayı her geçen gün artmaktadır. Yeterli miktarda istenen uçucu yağları üretemeyen ülkeler, yerel talebi karşılamak için bu yağları diğer bazı ülkelerden ithal etmek zorundadır. En çok ticaret yapılan uçucu yağ bileşiklerinin verileri araştırılmıştır ve bu bileşikler mentol, menton, karvon, eugenol ve linalool'dur. Bunların AB tarafından gıdalarda aroma maddesi olarak kullanıldığına dair kayıtlar bulunmaktadır. Mentolün her türlü kullanımının yıllık tüketimi, ham ürün değeri yaklaşık 300 milyon Amerika doları civarındadır, Mentol, yılda 30.000 metrik tonun üzerinde kullanılan dünyanın en yaygın kullanılan tat ve kokulardan biridir. 2000 yılında, küresel linalool üretimi için endüstri tahmini 12.000 tondu. Bunun yarısından fazlasının sentetik olduğu düşünülürken, geri kalanı doğal bitki terpenlerinden elde edilmektedir. Bazı bitkisel kokulara benzeyebilen sentetik kokuların aksine, uçucu yağların, sağlık faydalarının yeni keşiflerle doğrulanmasıyla daha çok talep görmektedir, bu da onları kullanıcılar için daha çekici ve cazip hale

getirmektedir. Bu noktada, eczacılık, kozmetik ve parfümeri sektörlerinde yeni fırsatlarla parlak bir geleceğe sahip gibi görünmektedir.

Kozmetik ürünlerde geniş bir çeşitlilikte benzersiz ve hoş kokular kazandırma yetenekleri, aynı zamanda yaşlanma karşıtı, antibakteriyel, UV koruması ve beyazlatma gibi biyoaktif ajanlar olarak da kullanılmaları, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde son derece istenen bileşenler haline gelmelerini sağlamaktadır (4).

Tarih boyunca, birçok nane türü çeşitli özellikler için dünyanın farklı bölgelerinde kullanılmıştır. Nane yağı, dünyanın en eski bitkisel ilaçlarından biridir. Kurutulmuş nanelerden elde edilen geleneksel ilaçların M.Ö. 1000'e uzanan zamanlarda, eski Mısır, Yunanistan ve Roma'da kullanıldığı belgelenmiştir (42).

M. × *piperita, M. aquatica* ve *M. spicata*'nın doğal hibritidir. *Mentha,* Yunanca Mintha'dan türetilmiştir, bu efsanevi bir dişi perinin ismidir ve tür adı olan piperita, biber anlamına gelen Latincedeki piper kelimesinden gelir, bu da bitkinin aromatik ve keskin tadına işaret eder (47). *M x dumetorum*, çok yıllık ve keskin kokulu bir bitki olup Türkiye'de genellikle "Kara nane" olarak bilinir (60).

Nanede 1 kg UY için 100 kg katı atık üretildiğini tahmin edilmektedir. 2016'da sadece Fransa'da lavantaya (*Lavandula x intermedia*) ait uçucu yağın üretimi 1439ton olarak gerçekleştiğine göre, bu, yılda 140.000 tonun üzerinde katı atık oluşturulduğu anlamına gelir (13). *Mentha arvensis* L. yüksek konsantrasyonda mentol içermesi nedeniyle ticari değeri yüksek türdür (272,273).

Menton, çeşitli uçucu yağlarda doğal olarak bulunan hafif kokulu bir monoterpendir. Doğada en yaygın izomerik formu, L-menton olarak da bilinen (2S,5R- trans-2-izopropil-5-metilsikloheksanon) formudur. Menton, mentol oldukça benzer bir yapıya sahiptir, ancak bir karbonil yerine ikincil bir alkol içerir. Farklı kokusuyla dikkat çeken menton, tatlandırıcı madde olarak, parfümeri ve güzellik ürünlerinde kullanılır. Menton, *Mentha piperita* gibi bitkilerin uçucu yağlarında bulunur. Menton ilk olarak 1881'de mentolün oksitlenmesiyle üretilmiş, ardından 1891'de uçucu yağlarda tanımlanmıştır. Menton, mentole benzer nane kokusuna sahiptir ve doğal olarak nane yağında bulunur. Menthon, mentol gibi aktif bir bileşen olarak ve asimetrik sentezlerde kullanılır (274,275).

Linalool (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol), açık zincirli bir monoterpendir, üçüncül alkol ve doğanın en önemli çiçek aromalarından biridir. Linalool, çiçek kokularındaki terpenoidlerin yaklaşık %70'ini oluşturur. Linalool, "hafif ve hoş, çiçeksi-odunsu, hafif bir narenciye dokunuşuyla" kokar. Linalool ayrıca çeşitli uçucu yağların ana bileşenlerinden biridir ve antibakteriyel ve antiparaziter özellikler gibi geniş bir biyolojik etkinlik yelpazesine sahiptir (276). Parfümeride ön notaların birçoğunda bulunan ana aromatik elementlerden biri olan linalool, çoğunlukla sentetik kökenli olup, şampuanlar, vücut yıkama ürünleri, sabunlar, saç spreyleri, nemlendiriciler ve deodorantlar gibi kozmetik ürünlerin %60 ila %90'ında bulunabilir. Linalool, çeşitli parfümlerde bulunan bir koku bileşenidir. Kozmetikler, kaliteli parfümler, saç ürünleri, kişisel bakım ürünleri ve ev temizlik ürünleri gibi kozmetik olmayan ürünlerde de bulunabilir. Dünya çapında yılda 1.000 metrik tonun üzerinde tüketilir. Linalool ve lavanta uçucu yağları, anksiyeteyi azaltarak parasempatik sinir aktivitesini teşvik ederek ve sempatik sinir aktivitesini azaltarak sedatif benzeri davranışsal etkilere sahiptir. Linalool ve lavanta yağı, antikonvülsan çalışmaların bağlamında nöronal uyarılabilirliği azaltma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (277,278).

Uçucu yağı dünya pazarında en çok yer kaplayan bitki türü nanedir. Mentol, menton ve karvon üretimi açısından *Mentha* türleri çok önemlidir. İlk 5 uçucu yağ arasında yer alan linalool da *M. piperita* 'Granada' 'nın UY'de yer alan ana bileşenidir. Bu kultivarın üreitimi için ileri araştırmalar önem arz etmektedir. *Mentha* türlerinin uçucu yağ üretiminde bu kadar büyük bir yer kaplaması uçucu yağ eldesi sonrası kalıntı ürünler hakkında daha kapsamlı çalışmalar yapmamız gerektiğini göstermektedir.

5.1. *MENTHA* ETANOL EKSTRELERİNİN FENOLİK BİLEŞİK ANALİZLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mentha piperita çeşitleri, *M. arvensis* ve *M. dumetorum* % 70'lik EtOH ile elde edilen ekstreler HPLC-PDA kromatografik yöntemi ile fenolik bileşikler kantitatif olarak belirlenmiştir. Analizleri değerlendirildiğinde alınan 11 *Mentha* çeşitinin ekstrelerinde 3 ana fenolik bileşik tespit edilmiştir. Eriositrin ortalaması 471,56 mg/g ekstre ile ilk sırada, Rosmarinik Asit ortalama 135,13 mg/ g ekstre ile ikinci sırada, Rutin ortalama 30,51 mg/g ekstre ile 3. sırada bulunmuştur. *Mentha* türleri arasında yer alan üç ana bileşen

temelinde *Mentha* türleri kıyaslanmıştır. Ana Bileşen olarak *Mentha x piperita* çeşitleri arasında ve *M. dumetorum* da eriositrin ilk sırada yer almaktadır. *M. arvensis* te ana bileşen rosmarinik asit olarak tespit edilmiştir, onu kafeik asit, eriositrin ve naringenin takip etmiştir. Tüm ana bileşenler arasında *M. arvensis* en düşük değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Naringenin ve kafeik asit miktarı açısından en yüksek değerlere *M. arvensis* in sahip olduğu görülmüştür.

Kromatografik olarak *Mentha* türleri arasında kantitatif analizi yapılan fenolik bileşik miktarının toplamı yüksekten düşüğe doğru sıralandığında *M. piperita* 'Citaro' > *M. piperita* 'Black mitcham' > *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* 'Granada' > *M. piperita* Piper-1 > *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Chocolate' > *M. dumetorum* > *M. piperita* 'Basilicuminze' > *M. piperita* 'Multimentha' > *M. arvensis* olarak tespit edilmiştir.

Mentha türlerinin eriositrin içeriklerinin kıyaslanmasın da *M. piperita* 'Black Mitcham' > *M. piperita* 'Citaro' > *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* Piper-1 > *M. piperita* 'Chocolate' > *M. piperita* 'Granada' > *M. dumetorum* > *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Basilicuminze' > *M. piperita* 'Multimentha' > *M. arvensis* olarak tespit edilmiştir.

Mentha türlerinin rosmarinik asit içeriklerinin kıyaslanmasın da *M. piperita* 'Basilicuminze' > *M. piperita* 'Granada' > *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Swiss' > *M. dumetorum* > *M. piperita* 'Citaro' > *M. piperita* Piper-1 > *M. piperita* 'Multimentha' > *M. piperita* 'Chocolate' > *M. piperita* 'Black mitcham' > *M. arvensis* olarak tespit edilmiştir.

Mentha türlerinin rutin içeriklerinin kıyaslanmasın da *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* 'Black mitcham' > *M. piperita* 'Basilicuminze' > *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* Piper-1 > *M. piperita* 'Citaro' > *M. piperita* 'Granada' > *M. dumetorum* > *M. piperita* 'Multimentha' > *M. piperita* 'Chocolate' > *M. arvensis* olarak tespit edilmiştir.

En yüksek Gallik Asit miktarını 0,192 mg/g ekstre ile *Mentha x dumetorum* içermektedir. Klorojenik asit kıyaslaması yapıldığında 4,418 mg/g ekstre ile *M. piperita* 'Granada' ilk sırada yer alır, ikinci sırayı 3,36 mg/g ekstre *M. piperita* 'Chocolate' almaktadır. 3,071 mg/g ekstre Klorojenik asit miktarı ile *M. piperita* 'Basilicuminze' üçüncü sırada yer almaktadır. İçerdiği kafeik asit miktarı bakımından *M. arvensis* ilk sırada yer alır. Bu miktar kendisine içerdiği kafeik asit miktarı açısından en yakın olan

nane türünden 10 kat daha fazladır. *M. arvensis* ise en yüksek naringenin içeriğine sahiptir. Bu miktar kendisine içerdiği naringenin miktarı açısından en yakın nane türünden 3 kat daha fazladır.

Koşar ve ark. 9 farklı nane çeşitlerinde bulunan fenolik bileşiklerinin incelemesini yapmışlardır. *M. aquatica; M. arvensis* var. *japanensis; M. x dalmatica; M. x piperita* Frantsila*; M. haplocalyx; M. moroccan; M. native* Wilmet*; M. spicata* var. crispa*;* ve *M. verticillata*. Bitki ekstreleri hidrodistilasyon ile üretilmiş ve deodorize edilmiştir (terpen fraksiyonunun uzaklaştırılması). Tüm bu ekstreler, asidik sulu metanol çözücü sistemi kullanılarak ters faz HPLC kolonunda ayrılmış ve analitik tespitleri yapılmıştır. Ekstraktlardaki referans fenolik bileşikler, HPLC ile hem nitel hem de nicel olarak analiz edilmiştir. Kafeik asit, rosmarinik asit, eriositrin, luteolin-7-O-glukozit, naringenin-7-O-glukozit, isorhoifolin, eriodiktyol, luteolin ve apigenin ekstraktlarda nicel olarak analiz edilmiş ve fenol miktarları verilmiştir. UV detektörü ile 280nm, 360 nm ve 517 nm de analitik testleri yapılmış *M. arvensis* var. *japanensis*'de her iki UV ölçümünde de ana bileşen rosmarinik asit ana bileşen tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuclar Koşar ve ark. yapmış olduğu bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur. *M. x piperita* Frantsila 280nm, 360 nm ve 517 nm de analitik testleri yapılmış ve Eriositrin ana bileşen bulunmuştur. Çalışmamız da *M. piperita* çeşitlerinin ana bileşeni eriositrin olarak bulunmuştur, sonuçlarımız bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur (279).

Dorman ve ark. yaptığı çalışma *M. x piperita*'nın üzerinde detaylı bir çözücü ekstre ilişkisini inceleyen bir araştırmada *M x piperita* yaprakları petrol (PE), diklorometan (CH_2Cl), asetonitril (ACN), etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), n-bütenol (n-BuOH) ve su (H_2O) ekstrelerinin fenolik profilleri incelenmiştir. Nicel olarak, MeOH, H_2O ve n-BuOH kullanımı en büyük ekstrakt verimlerini elde edildiği; ancak nitel olarak, EtOAc, MeOH, H_2O ve ACN çözücülerinin toplam fenol ve toplam flavonoid içeriği en yüksek ekstraktları izole ettiği görülmüştür. Farklı ekstraktlar için nitel-nitel analiz, HPLC-PDA analizi ile sunulmuştur. Alıkonma zamanı ve UV spektral karşılaştırmalarıyla belirlenen fenolik bileşenler arasında kafeik asit, rosmarinik asit ve flavonoidler bulunmaktadır. Flavonoidler arasında flavanon aglikon eriodictyol ve glikozidler eriositrin (eriodictyol-7-O-rutinosid), hesperidin (hesperetin-7-O-rutinosid) ve naringenin-7-O-glukozidler, isorhoifolin (apigenin-7-O-rutinosid) ve luteolin-7-O-glukozid bulunmaktadır. Eriositrin ve rosmarinik asit sırasıyla %37.6 ve %37.4 ile belirlenen en bol bulunan bileşenlerdir,

bunu sırasıyla %16.1 ile luteolin-7-O-glukozid, %6.5 ile hesperidin, %1.2 ile izorhoifolin, %0.5 ile eriodictyol, %0.3 ile kafeik asit, %0.3 ile luteolin ve %0.1 ile naringenin-7-O-glukozid izlemektedir. *Mentha piperita* çeşitleri üzerine yapmış olduğumuz çalışma verileri bu çalışma ile uyumludur (280).

Fialova ve ark. *M. piperita* yaprak ve köksaplarının infüzyonlarının HPLC metodu ile fenolik bileşikleri incelenmiştir. Nane bitkisinin toprak üstü kısımlarının yaprakların ve rizomların antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılabilir olduğunu keşfettikleri rapor edilmiştir. *Mentha* yaprakları ve liyofilizatları, rosmarinik asit, eriositrin, luteolin glikozitleri, apigenin glikozitleri ve kafeik asit türevleri gibi fenolik bileşikler bakımından zengindir. *M. piperita* yapraklarında ana bileşikler eriositrin ve rosmarinik asittir. Son zamanlarda, rizom liyofilizatlarının fenolik bileşiklerinin sıvı kromatografisiyle ayrılması ve tanımlanması yapılmaktadır. Rizom örneklerinde üç fenolik bileşik hesperidin, rosmarinik asit, kafeik asit tespit edilmiştir ve yaprak örneklerinde sekiz bileşik; eriositrin, Luteolin-7-*O*-rutinosit, Luteolin-7-*O*-glucuronit, Apigenin-7-*O*-rutinosit, kafeik asit, salvianolik asit, Hesperetin-7-*O*-rutinosit ve rosmarinik asit tanımlanmıştır. Nane rizomları yaprakları kadar fenolik bileşikler açısından zengin değildir. Rizomların infüzyonunda ana bileşik rosmarinik asitti (93 μg/mL), ancak içeriği yapraklardakinden üç kat daha düşüktü (286 μg/mL). Önceki çalışmalarda olduğu gibi eriositrin nane yapraklarının infuzyonunda ana fenolik bileşik olarak tanımlanmıştır 349 ± 10.52 μg/mL. Rosmarinik asit 286.4 ± 5.69 μg/mL. Rutin 204.1 ± 9.02 μg/mL olarak tespit edilmiştir (281).

Cam ve arkadaşları *M. piperita* ve *M. spicata*'nın fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerini araştırmış ve kıyaslamıştır. *M. piperita* ve *M. spicata*'nın fenolik bileşikleri sırasıyla 47 mg/g eriositrin ve 27 mg/g Rosmarinik asit olarak bulunmuştur. Çalışmamız da incelenen *M. piperita* çeşitlerinin ana bileşen tespitlerimiz ile uyumludur (282).

Akşit ve arkadasları *Mentha x dumetorum* Schult. bitki örneklerinin (500 g) öğütülmüş toprak üstü kısımlarını, açık atmosferde 1 saat boyunca su içinde (2 L) kaynattı ve oda sıcaklığına kadar soğuttu. Bitki kalıntısı süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. *M. dumetorum* su ekstresi HPLC analizi yapıldı. Sonuç olarak eriositrin ve rosmarinik asit ana bileşen olarak tespit edilmiştir. Diğer bileşenler Luteolin-7-O-

rutinosit, Hesperidin Apigenin-7-O-rutinosit ‘dir. Çalışmamızda yer alan *M. dumetorum* ekstreleri ile sonuçların uyumlu oldugu gözlenmiştir (283).

Kapp ve ark. çalışmasında piyasada bulunan ticari *Mentha x piperita* çaylarını (n = 27), kaba bitki veya poşet çay formunda gıda marketlerinden, sağlık mağazalarından perakende eczanelerden satın alınmıştır. Demleme süresi, doğada yetişen *M.* × *piperita* ile 1 dakikadan 12 saate kadar test edilmiştir; özütleyici su başlangıçta demlemeye 100 °C sıcaklıkta eklenmiştir. Demleme süresi 5 dakikada polifenollerin tamamen çıkarıldığı bulunmuş, daha uzun demleme süresi içeriği artırmamıştır. Bu nedenle, demleme işlemi, paket üzerinde yazılı olan üreticinin talimatlarına göre damıtılmış suyla yapılmıştır. Bu amaçla, maksimum önerilen bitki miktarı ve ekstraksiyon süresi kullanılmıştır. Su veya bitki malzemesi miktarı belirtilmemişse, sırasıyla 200 ml ve iki çay kaşığı (2 × 5 ml, 1.0 g) alınmıştır. Ekstraksiyonun ardından, infüzyonlar filtre kağıdından süzülmüş ve 20 °C'de 4000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir Ön çalışmalar, sıcak suyla yapılan infüzyonlarda (veriler gösterilmemiştir), 5-15 dakikalık çekim süresinin polifenolik bileşiklerin tamamen çıkarılması için yeterli olduğunu göstermiştir. Çekim süresinin uzatılması toplam polifenol içeriğini artırmamaktadır. Ticari nane çayı infüzyonları birçok sekonder metabolit içermekte olup, en baskın olarak flavanon ve flavon glikozitlerine sahiptir. Toplam 22 polifenolik bileşik tanımlanmıştır, bunlardan 12 tanesi nicel olarak belirlenmiştir. Ayrıca, malik ve sitrik asitler tespit edilmiştir. Polifenol içeriği geniş bir ölçekte değişmektedir, ancak tüm infüzyonların kompozisyon profili benzerdir. Tüm çaylardaki ana fenolik bileşik (iki örnek hariç) eriositrin olarak bulunmuştur. İkinci en bol fenolik bileşik, 3.2-28.9% aralığında bulunan luteolin-O-rutinosit idi. Rosmarinik asit, ayrıca geniş bir konsantrasyon aralığında (2.1-54.2%) bulunmuştur. Peppermint'te ilk kez ölçülen salvianolik asit B içeriği, 1.0-9.7% aralığında bulunmuştur. Narirutin, diosmin, eriodiktiol ve apigenin-O-rutinosit ise az miktarda tespit edilmiştir (284). Çalışmalarımız da elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmada yer alan verilerle uyumlu bulunmuştur.

Mentha x piperita çeşitleri’nın kimyasal analizleri kısıtlıdır. Yapılan çalışmalar da çoğunlukla uçucu yağları üzerine yapılmıştır.

Park ve ark. *Mentha* türleri üzerine yapmış oldukları araştırmada %80 metanol de hazırlanmış ekstre *Mentha x piperita* ‘Chocolate’nın fenolik asit değerleri; klorojenik asit: 168,50 ± 1,96 µg/g kuru ağırlık(KA), kafeik asit: 35,45 ± 2,68 µg/g KA, epikateşin:

101,70 ± 11,24 µg/g KA, p-kumarik asit: 6,80 ± 2,05 µg/g KA, ferulik asit: 42,71 ± 7,76 µg/g KA, benzoik asit: tespit edilemedi, rutin: 3470,10 ± 165,59 µg/g KA, trans-sinamik asit: 46,55 ± 6,18 µg/g KA, kuersetin: 397,10 ± 48,51 µg/g KA, kampferol: 14,50 ± 5,38 µg/g KA, rosmarinik Asit: 19,85 ± 3,53 µg/g KA şeklinde bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ana bileşen 517,494 µg/g ile eriositrin, 81,523 µg/g rosmarinik asit ve 19,352 µg/g değeri ile rutin olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler Park ve ark. çalışması ile örtüşmemektedir. Bu farklı ekstraksiyon çözücüsünün kullanılmasına, iklim koşullarına, hasat tarihine ya da kurutma yöntemine kadar birçok sebepten dolayı meydana gelmiş olabilir. İleri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Gallik asit (En polar), klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve rutin bileşikleri rosmarinik asit ve eriositrinden daha yüksek polariteye sahiptir bu yüzden metanol ekstresinde daha yüksek olarak bulunmuş olabilir (285).

Mentha x piperita L. kültivarlarının fenolik bileşikleri üzerine yapılan araştırmalar oldukça sınırlıdır. Daha çok uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. 5 farklı *M. piperita* çeşidinın uçucu yağ analizleri yapılmış ve şu sonuçlar elde edilmiştir: *M. piperita* 'Citaro' %17,3 menton ve %51,8 mentol, *M. piperita* 'Granada' %48,9 linalool ve %21,2 linalyl asetat, *M. piperita* 'Swiss' %25,8 menton ve %41,5 mentol, *M. piperita* 'Multimentha' %48,4 menton ve %28,1 mentol, *M. piperita* 'Chocolate' %18,1 menton ve %51,8 mentol içermektedir (5).

Bir çalışmada, *M. arvensis* ve *M. piperita* uçucu yağları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, M. piperita'da mentol oranı %58,80 ve menton oranı %6,42 iken, *M. arvensis*'te mentol oranı %84,63 olarak bulunmuştur (286).

Mentha × *dumetorum*, *M. aquatica* ve *M. longifolia*'nın bir melezidir. Önceki çalışmalarda, Karadeniz kökenli yedi örnekte uçucu yağ verimlerinin %0,2–1,5 olduğu bildirilmiştir. Dört örnekte ana bileşenler olarak mentofuran/1,8-sineol (%18–41/%8–13) bulunurken, bunlardan biri mentil asetat (%11), pulegon (%9), mentol (%7) ve menton (%7) içermiştir (10).

Tek bir örnekten elde edilen %0,4 uçucu yağ, mentofuran (%28), mentil asetat (%18), β-karyofilen (%12), mentol (%9), germakren D (%6), pulegon (%3) ve menton (%3) içermiştir. Önceki çalışmalarda benzer sonuçlar bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, mentofuran/pulegon/mentol (%25/%17/%11) ve mentil asetat/mentofuran/pulegon (%33/%27/%10) içeren örnekler ana bileşenler olarak karşılaşılmıştır (287).

5.2. *MENTHA* ETANOL EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mentha türlerinin analizlerin de *M. piperita* çeşitleri, *M. dumetorum* ve *M. arvensis*'e göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite gösteren 4 *Mentha* türleri değerlendirilmeye alındığın da ABTS•$^{+}$ metodunda en yüksek antioksidan aktivite gösteren *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Granada' > *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* 'Multimentha' olarak bulunmuştur. DPPH• yönteminde *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Citaro' > *M. piperita* Piper-1 olarak izlenmiştir. FRAP metodunda *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* Piper-1 > *M. piperita* 'Granada' olarak gözlemlenmiştir. CUPRAC antioksidan aktivite tayin yöntemin de en yüksek aktivite *M. piperita* 'Citaro' > *M. piperita* 'Yakima' > *M. piperita* 'Swiss' > *M. piperita* 'Chocolate' olarak tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitelerine genel bir bakışla bakıldığın da, *M. piperita* 'Yakima' her yöntem de yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Daha sonra en yüksek aktiviteyi tüm testler de *M. piperita* 'Swiss' olarak tespit edilmiştir. Bunları *M. piperita* 'Citaro', *M. piperita* 'Granada', *M. piperita* Piper-1 takip etmiştir.

Dorman ve arkadaşları, 9 farklı nane türünü 4 farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi ile değerlendirmiştir. İncelenen nane türleri şunlardır: *M. spicata* var. *crispa, M.x piperita* 'Frantsila', *M. haplocalyx, M. aquatica, M. arvensis* var. *japonensis, M.x dalmatica, M. piperita* 'Native Wilmet', *M. spicata* 'Morocco' ve *M.x verticillate.* Kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemleri ise Demir (III)'ten Demir (II)'ye İndirgeme Aktivitesi, Demir (II) Şelasyon Aktivitesi, 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Temizleme Aktivitesi ve Askorbat-Demir (III) Katalizli Fosfolipid Peroksidasyonu ölçüm yöntemidir (6).

Demir (III)'ten Demir (II)'ye İndirgeme Aktivitesi:

Bu yöntemde, absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiklendi ve doğrusal regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar, ekstrakt gramı başına miligram askorbik asit cinsinden askorbik asit eşdeğerleri (AscAE) olarak sunuldu. AscAE değeri ne kadar büyükse, indirgeme gücü o kadar yüksek olur. BHA, BHT ve Pycnogenol pozitif kontroller olarak kullanıldı. Ölçümler en az dokuz kez tekrarlandı. Absorbans (Abs700 nm) ve örnek konsantrasyonu (mg/mL) grafiklerinden hesaplanan AscAE

değerlerine göre, *M.x piperita* 'Frantsila' çeşidi, diğer ekstraktlara göre önemli ölçüde ($p < 0.05$) daha iyi bir demir (III) indirgeyiciydi ve *M. piperita* 'Native Wilmet' çeşidi bunu takip etti. Hibrit *M.x verticillata* ekstraktı, en az aktif olan ekstrakt iken, *M. aquatica* ve *M. haplocalyx* ekstraktlarının etkinliği arasında istatistiksel bir fark yoktu ($p > 0.05$). *M. arvensis var. japonensis, M.x dalmatica, M. 'Morocco'* ve *M. spicata var. crispa* ekstraktlarının aktiviteleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Demir (II) Şelasyon Aktivitesi:

Bu yöntemde, farklı ekstraktların demir (II) iyonlarını şelatlama yeteneği incelendi. 9 farklı nane ekstraktı tahmin edilen IC_{50} değerlerine göre iki gruba ayrıldı: Grup 1, *M. spicata var. crispa, M.x piperita* 'Frantsila' ve M. haplocalyx; Grup 2, *M. aquatica, M. arvensis* var. *japonensis, M.x dalmatica, M. piperita* 'Native Wilmet', *M. spicata* 'Morocco' ve *M.x verticillata*. Grup 2 üyeleri, Grup 1 üyelerinden anlamlı ölçüde ($p < 0.05$) daha iyi şelatlayıcıydı. Her grup içinde üyeler arasında potansiyel açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Temizleme Aktivitesi:

Tüm *Mentha* ekstraktları, pH 7.4'te DPPH• radikallerini doz bağımlı bir şekilde temizleyebildi. Tahmin edilen IC_{50} değerlerine göre, *M.x piperita* 'Frantsila' ekstraktı en güçlü temizleyici iken, bunu sırasıyla *M. piperita* 'Native Wilmet', *M.x dalmatica* ve *M. spicata* var. *crispa* takip etti. *M. arvensis* var. *japonensis, M. spicata* 'Morocco', *M. haplocalyx, M. aquatica* ve *M.x verticillata*'nın DPPH• temizleme aktiviteleri de yüksek bulundu, ancak bu testte pozitif kontroller olan askorbik asit, BHA, BHT veya Pycnogenol kadar etkili değildi.

Askorbat-Demir (III) Katalizli Fosfolipid Peroksidasyonu:

Bu yöntemde, 9 farklı *Mentha* türü ekstraktının antioksidan aktivitesi incelendi. Tahmin edilen IC_{50} değerlerine göre en aktif ekstrakt, *M.x piperita* 'Frantsila' çeşidindan elde edilen ekstrakt olup, bunu *M. spicata 'Morocco'* ve *M. piperita* 'Native Wilmet' kültivarlarından ve *M. spicata* var. *crispa*'dan elde edilen ekstraktlar izledi. En aktif sonraki ekstraktlar, hibrit *M.x verticillata* ve *M.x dalmatica* çeşitlerinden elde edilen ekstraktlar olup, bu ekstraktların etkinliği *M. arvensis* var. *japonensis* ekstraktından anlamlı olarak daha düşük fakat *M. aquatica* ekstraktından daha yüksekti. *M. haplocalyx* ekstraktı, bu deneysel modelde ne *M. aquatica* ne de *M.*

arvensis var. *japonensis* ekstraktları ile anlamlı olarak farklı değildi. Hiçbir ekstrakt, bu testte pozitif kontroller BHA, BHT ve Pycnogenol kadar etkili değildi.

Seçilen *Mentha* türlerinden elde edilen su çözünebilir ekstraktlar, indirgeme gücü, şelatlama gücü, sentetik radikal DPPH•'yi temizleme yetenekleri ve hidroksil radikal aracılı fosfolipid bozulmasına karşı koruyucu etkileri açısından değerlendirildi. Ayrıca, her ekstraktın analitlerinin niteliksel ve niceliksel analizi, PDA deteksiyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm ekstraktlar, her antioksidan testinde değişen derecelerde etkinlik gösterdi. *M.x piperita* 'Frantsila' çeşidi, doğal antioksidanların iyi bir kaynağı olarak öne çıktı. Folin-Ciocalteu reaktifi ve HPLC kullanılarak belirlenen en yüksek toplam fenol seviyelerine sahipti ve bu, yüksek eriositrin ve rosmarinik asit seviyelerinden kaynaklanıyordu. Hibrit *M.x verticillata*'dan elde edilen ekstrakt, şelatlama ve askorbat-demir (III) katalizli fosfolipid peroksidasyon testleri dışında, tüm testlerde en az aktif ekstrakt idi. Genel olarak, bu çalışmada kullanılan *Mentha* türlerinin in vitro olarak değerlendirilebilir antioksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür (6). Bizim çalışmalarımız da en yüksek antioksidan aktiviteler *M. piperita* çeşitlerinde yer almıştır ayrıca bu çalışmada *M.x piperita* 'Frantsila' da eriositrin ve rosmarinik asit yüksek bulunmuştur bu çalışmada yer alan antioksidan aktivite ve fenolik bileşikler ile ilgili sonuçlar çalışmamız uyumludur.

Ayar-Kayali ve ark., yaptıkları çalışmada, Türkiye'ye özgü olan *S. leptoclada* ve *M. dumetorum*'un su ekstraktında toplam fenolik bileşikler, hidroksil ve DPPH• radikal temizleme kapasiteleri, indirgeme gücü ve antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. *S. leptoclada* ve *M. dumetorum*'un toplam antioksidan kapasiteleri, tiyosiyanat yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre, *S. leptoclada* ve *M. dumetorum*'un toplam antioksidan kapasiteleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($P < 0,01$) olup, inkübasyon süresi ile anlamlı bir korelasyon göstermiştir ($r = 0,943, 0,976$; $P < 0,01$) Ayrıca, *S. leptoclada*'nın toplam antioksidan kapasitesi, diğer belirlenen antioksidan parametreler *M. dumetorum*'dan anlamlı derecede yüksekti. *S. leptoclada* ve *M. dumetorum*'un toplam fenolik içerikleri ile araştırılan antioksidan temizleme kapasiteleri arasındaki pozitif korelasyonun belirlenmesi, bu parametrelerin bu bitkilerin antioksidan özellikleri üzerinde sinerjik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (287).

Nickavar ve arkadaşları, beş farklı *Mentha* türünün; *M. piperita, M. pulegium, M. rotundifolia, M. longifolia* ve *M. spicata* etanol ekstrelerinin serbest radikal temizleme aktivitesini ve antioksidan kapasitesini DPPH• ve ABTS•+ testleri ile değerlendirmiştir. Çalışmada, beş *Mentha* türünden elde edilen etanol ekstrelerinin antioksidan kapasiteleri (IC_{50} değerleri) ölçülmüş ve toplam fenolik içerikleri belirlenerek karşılaştırılmıştır (288).

DPPH• testine göre, tüm ekstreler belirgin bir konsantrasyon bağımlı antiradikal etki göstermiş, ancak inhibe edici aktiviteleri farklılık göstermiştir. En yüksek temizleme aktivitesi *M. piperita*'da gözlenmiş [IC_{50}=13,32 (12,12-14,64) µg/ml], en düşük ise *M. spicata* için bulunmuştur [IC_{50}=87,89 (81,66-94,59) µg/ml]. Ekstrelerin IC_{50} (DPPH•) değerleri şu sırayla artmıştır: *M. piperita* < *M. pulegium* < *M. rotundifolia* ≤ *M. longifolia* < *M. spicata*. ABTS•+ temizleme testinden elde edilen verilere göre, ekstreler bu radikal üzerinde konsantrasyona bağlı bir aktivite göstermiş, ancak belirgin bir fark görülmemiştir. Diğer yandan, ekstreler ABTS•+ radikal katyonu üzerinde DPPH• radikaline göre daha zayıf bir inhibisyon etkisine sahip olmuştur. Test edilen ekstrelerin fenolik içeriği önemli ölçüde farklılık göstermiş ve 150,91 ila 433,60 µg/mg arasında değişmiştir. *M. piperita* en yüksek toplam fenolik içeriğe sahipken (433.60±19.62 µg/mg), *M. spicata* en düşük içeriğe sahip olmuştur (150,9±5,14 µg/mg). Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri azalan sırayla şu şekildedir: *M. piperita* > *M. pulegium* ≥ *M. rotundifolia* ≥ *M. longifolia* > *M. spicata.*

ABTS•+ IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında, *Mentha* türleri arasında şu sıra elde edilmiştir: *M. pulegium* < *M. piperita* < *M. rotundifolia* < *M. spicata* < *M. longifolia.* En yüksek aktivite *M. pulegium*'da gözlemlenmiştir. Ekstrelerin ABTS•+ temizleme aktivitesi, DPPH• temizleme kapasitesinden farklıdır ve iki test arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Bu fark, testlerdeki farklı kimyasal mekanizmalar ve radikallerin farklı kimyasal özellikleri ile açıklanabilir. Örneğin, ekstrelerdeki antioksidan bileşikler ile ABTS•+ ve DPPH• arasındaki reaksiyonların stoikiyometrisi farklıdır ve ABTS•+ ve DPPH•'nin bileşiklerle olan elektron indirgeme potansiyelleri farklıdır. Ayrıca, radikallerin stereo-seçiciliği, ekstrelerin radikallerle reaksiyona girme kapasitesini etkileyebilir.

Anti-DPPH• etkinliği [1/IC50(DPPH•) olarak ifade edilen] ile toplam fenolik içerik (TPC) arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur ($r2>0.989$, $p \leq 0.0005$). Bu korelasyon, fenolik içeriğin, *Mentha* türlerinin ekstrelerinin antioksidan ve serbest radikal temizleme etkilerinin bir kısmından sorumlu olabileceğini öne sürmektedir. Ancak, ekstreler arasında TPC ve 1/IC50(ABTS•+) değerleri arasında benzer bir ilişki gözlemlenmemiştir. Toplam ekstreler, farklı aktivitelere sahip birçok farklı bileşik içeren karmaşık karışımlardır. Dolayısıyla, test edilen türlerin ABTS•+ temizleme aktivitesi, ekstrelerdeki fenolikler ve diğer bileşiklerin karışımındaki etkileşimlerden kaynaklanabilir ve bu bileşikler sinerjik etki gösterebilir.

Genel olarak, Labiatae türleri terpenoidler ve fenolik bileşiklerin zengin kaynaklarıdır. Bu nedenle, *Mentha* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin, en azından kısmen, antioksidan ve serbest radikal temizleme etkilerinden sorumlu olduğu muhtemeldir. Ancak, bu bitkilerde bulunan antioksidan aktivitenin bir kısmını fenolik yapıya sahip olmayan diğer bileşiklerin de açıklayabileceği düşünülmektedir (288). Bu çalışma da her iki antioksidan aktivite tayin yönteminde de *M. piperita* yüksek antioksidan aktivite göstermiştirve sonuçlar bizim çalışmalarımız sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Rashid ve arkadaşları, *Mentha arvensis* üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada, dört farklı çözücü ekstraktının (metanol, etanol, aseton ve distile su) antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir. Antioksidan özellikler DPPH• ve indirgeme gücü testleri ile belirlenmiştir. Dört ekstrakt arasında, *Mentha arvensis'*in metanol ekstraktı 30,48 ± 0,95 mg QE/g flavonoid içerirken, sulu ekstrakt en yüksek toplam fenolik içerik (142,2 ± 0,83 mg QE/g) ve toplam alkaloid içerik (78,2 ± 0,21 mg TE/g) göstermiştir. Etanol ekstraktı ise toplam tanen içeriği (17,41 ± 0,38 mg ETA/g CE) ve indirgeme gücü (41,17 ± 0,87 mg ETA/g) bakımından en yüksek değeri sergilemiştir. Bu sonuçlar, *Mentha arvensis*'in etanol ekstraktının en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, distile su hariç diğer üç çözücü, değerli anti-mutajenik davranış sergilemiştir. HPLC sonuçları da bu bulguları desteklemekte olup, bu bitkinin antioksidan ve anti-mutajenik ajanlar olarak büyük potansiyele sahip olduğunu önermektedir (289). Çalışmamız da *M. arvensis* 'in etanol ekstraktı kullanılmıştır ama bu çalışmanın aksine DPPH• yöntemin de düşük antioksidan aktivite gözlemlenmiştir.

5.3. *MENTHA* ETANOL EKSTRELERİNİN FENOLİK BILEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTALERİNİN KORELASYONUNUN İNCELENMESİ

Mentha x piperita çeşitleri, *M. dumetorum* ve *M. arvensis* nanelerinin antioksidan aktiviteleri ile fenolik bileşiklerin korelasyonu incelenmiştir. Literatür de antioksidan aktivite tayin methodları ile toplam fenolik bileşiklerin korelasyonu yapılmış ve yer almıştır. Gerçekleştirmiş olduğumuz yeni korelasyon yaklaşımı ile *Mentha* türlerinin antioksidan aktivite tayin metodları ve fenolik bileşikleri ile korelasyonun incelenmesi bize daha detaylı bilgiler sunmaktadır. DPPH• Metodu ile kafeik asit, rutin, naringenin ve eriositrin bileşikleri ile yüksek korelasyon bulunmuştur. ABTS•+ metodu ile rosmarinik asit ve apigenin yüksek korelasyon göstermiştir. FRAP metodunda rosmarinik asit, apigenin ve rutin ile yüksek korelasyon göstermiştir. CUPRAC metodu ile fenolik bileşikler arasında bir korelasyon bulunmamıştır.

Zeljkovic ve ark., yapmış oldukları çalışmada *Mentha aquatica, Mentha arvensis, Mentha cervina, Mentha longifolia, Mentha microphylla, Mentha pulegium, Mentha x piperita, Mentha spicata, Mentha suaveolens, Mentha x villosa Mentha* türlerinin metanolik ekstreleri ve uçucu yağları çok yönlü incelenmiştir, antioksidan aktivite tayin yöntemi olarak DPPH• yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar, kuru ekstrakt başına Trolox eşdeğerleri olarak gösterilmiş olup, *M. cervina* için 22,79 ± 1,85 mg TE/g'den M. x villosa için 106,04 ± 3,26 mg TE/g'ye kadar değişmekteydi. Nanelerden fenolik bileşiklerin alkolik ve sulu bitki ekstrelerindeki antioksidan aktivitelerin ana taşıyıcıları olduğu iyi bilinmektedir. Beklenildiği gibi, sunulan veriler bu gerçeği destekledi. Metanolik ekstrelerin toplam fenolik içeriği ile antioksidan aktivitesi arasındaki Pearson korelasyon katsayısı 0,8307 idi, toplam flavonoid içeriği ile antioksidan aktivitesi arasındaki korelasyon ise biraz daha düşüktü, yani 0,7105 idi. En yüksek toplam fenolik içerik örnekleri *M. suaveolens, M. x villosa* ve *M. x piperita 'Bergamot'* örneklerinde belirlenmişti ve bu türler en yüksek antioksidan aktivitelere sahipti (290).

Benabdallah ve arkadaşları, *M. aquatica, M. arvensis, M. piperita, M. pulegium, M. rotundifolia* ve *M. villosa* türlerinin fenolik bileşikleri, flavonoid içerikleri ve tanen miktarları üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Her bir tür için,

açık havada kurutulmuş bitki kısımları (2 g), bir havan değirmeninde ince şekilde öğütülmüş ve 50 mL %80 metanol ile oda sıcaklığında 24 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 0,45 mm'lik bir Millipore filtresi ile filtre edilmiş ve analiz için koyu renkli şişelerde 4 °C'de saklanmıştır.

Çalışmada, altı nane türünün metanolik ekstrelerinin yüksek fenolik, flavonoid ve tanin içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu türlerin antioksidan yeteneğinin önemli olduğu belirlenmiştir. Verilere göre, *M. aquatica* en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olarak etkili bir antioksidan yeteneği sergilemiştir. *M. arvensis ve M. piperita* ise *M. aquatica*'ya yakın içeriklere sahip olarak onu izlemiştir. *M. pulegium, M. rotundifolia* ve *M. villosa* ise en düşük fenolik içeriklere sahip türler olmuştur.

Ayrıca, çalışmada yapılan analizler, altı nane türünün fenolik içerikleri ile antioksidan aktivite arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, nane türlerinin antioksidan aktivitesinin büyük ölçüde taninler ve polifenollerle ilişkili olduğunu, flavonoidlerin ise bu aktivite üzerinde daha az etkili olduğunu ortaya koymaktadır. (291).

Nickavar ve arkadaşları, *M. piperita, M. pulegium, M. rotundifolia, M. longifolia* ve *M. spicata* bitkilerinin etanol ekstraktlarının toplam fenolik bileşikleri ve antioksidan kapasitelerini belirlemiştir. Bu çalışmada, bitki ekstraktlarının serbest radikal süpürme aktivitesini ve antioksidan kapasitesini değerlendirmek için yaygın ve yararlı yöntemler olarak iki farklı in vitro DPPH• ve ABTS•+ testi kullanılmıştır (292).

Fenolik bileşikler, hidroksil gruplarından dolayı serbest radikalleri temizleme yetenekleri nedeniyle bitkisel materyallerin antioksidan aktivitelerine önemli katkıda bulunan ana bileşik grubu olarak kabul edilir. Bu nedenle, bu çalışmada beş farklı *Mentha* türünden elde edilen etanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri (IC_{50} değerleri) iki yöntem kullanılarak ölçülmüş ve toplam fenolik içerikleri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

Testlerde ekstraktların davranışlarındaki farklılıklar, testlerde yer alan kimyasal mekanizmalar ve radikallerin farklı kimyasal özellikleri ile açıklanabilir. Antioksidan değerlendirmesi için kullanılan radikal sistemi, test sonuçları üzerinde bazı etkilere sahiptir. Örneğin, ekstrakttaki antioksidan bileşikler ile ABTS•+ ve

DPPH• arasındaki reaksiyonların stokiyometrisi farklıdır ve ABTS•+ ve DPPH•'nin elektron indirgeme potansiyeli, ekstrakttaki bileşiklere göre değişir. Ayrıca, radikallerin stereoselektivitesi, ekstraktların radikallerle reaksiyona girme kapasitesini etkileyebilir.

1/IC50(DPPH•) olarak ifade edilen anti-DPPH• etkinliği ile toplam fenolik içerik (TPC) arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur ($r^2 > 0,989$, $p \leq 0,0005$). Bu korelasyon, fenolik içeriğin, *Mentha* türlerinin ekstraktlarının antioksidan ve serbest radikal süpürme etkilerinin bir kısmından sorumlu olabileceğini öne sürmektedir. Ancak, ekstraktlar arasında TPC ve 1/IC50(ABTS•+) değerleri arasında benzer bir ilişki gözlemlenmemiştir.

Toplam ekstraktlar, farklı aktivitelere sahip birçok bileşiğin kompleks karışımlarıdır. Dolayısıyla, test edilen türlerin ABTS•+ temizleme aktivitesi, fenoliklerin ve karışımdaki diğer bileşiklerin kompozisyonundan kaynaklanabilir ve bu bileşiklerin sinerjik etkisi olabilir. Genel olarak, Lamiaceae türleri, terpenoitler ve fenolik bileşiklerin zengin kaynaklarıdır. Bu nedenle, *Mentha* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin, en azından kısmen, antioksidan ve serbest radikal süpürme aktivitelerinden sorumlu olduğu muhtemeldir. Ancak, fenolik yapıya sahip olmayan diğer bileşikler, bu bitkiler için bulunan antioksidan aktivitenin bir kısmını açıklayabilir.

Bu çalışmanın sonuçları, *Mentha* cinsinin serbest radikal süpürücüleri ve biyolojik ve gıda sistemlerinde reaktif oksijen türleri (ROS) saldırısını sınırlayabilecek potansiyel serbest radikal süpürücüleri olarak önemli olduğunu göstermektedir (292).

Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada DPPH• IC50 değeri ile kafeik asit ve naringenin ile pozitif, rutin ve eriositrin ile negative korelasyon göstermiştir. DPPH• IC50 antioksidan aktivite tayin yönteminde birden fazla bileşiğin bu korelasyon da yer alması bu çalışmada ki sonuçlarla uyum göstermektedir. Çalışmamızda $ABTS^{\bullet+}$ yöntemi ile rosmarinik asit ve apigenin bileşikleri negatif korelasyon göstermesi bu çalışmaya göre farklılık göstermiştir.

5.4. *MENTHA* KALINTI EKSTRELERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yaptığımız çalışmada, 11 farklı nane türünün etanol ekstresi, katı kalıntı ekstresi ve atık su ekstresinin 11 farklı fenolik bileşik değerleri ölçülmüştür. Her bir ekstre grubu için 11 farklı fenolik bileşiğin toplam değerleri incelenmiştir.

A ile belirttiğimiz etanol ekstrelerinin toplam fenolik bileşiklerinin ortalama değeri 642,15 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir. B olarak belirttiğimiz katı kalıntı ekstresi toplam fenolik bileşiklerin ortalama değeri 416,87 mg/g ekstre olarak bulunmuştur. S olarak belirttiğimiz atık su ekstresinin fenolik bileşiklerin ortalama değeri ise 375,90 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir. Katı atık ekstrelerinde %36 kayıp, atık su ekstrelerinde %42 kayıp yaşandığı tespit edilmiştir. Katı atıklardan elde edilen ekstrelerde daha az kayıp yaşandığı belirlenmiştir. Bunun sebebi B grubu ekstreleri için etanol gibi güçlü bir çözeltinin kullanılıyor olması olabilir.

Üç farklı ürün grubunda da ana bileşikler eriositrin, rutin ve rosmarinik asit olarak tespit edilmiştir. A grubunda, eriositrin ortalama değeri 471,65 mg/g ekstre ile ilk sırada yer almaktadır. B grubunda 283,43 mg/g ekstre ortalama eriositrin değeri bulunmuş ve %40 kayıp olduğu görülmüştür. S grubunda 287,37 mg/g ekstre ortalama eriositrin değeri tespit edilmiş ve %40 kayıp olduğu belirlenmiştir. Eriositrin açısından, B ve S grubunun birbirine üstünlüğü görülmemiştir.

A grubunda rosmarinik asit ortalama değeri 135,09 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir ve tüm fenolik bileşikler arasında en çok yer kaplayan ikinci bileşik olarak belirlenmiştir. B grubunda rosmarinik asit ortalama değeri 101,23 mg/g ekstre olarak tespit edilmiş ve %25'lik bir kayıp yaşandığı görülmüştür. S grubunda rosmarinik asit miktarı 73,71 mg/g ekstre olarak tespit edilmiş olup %45'lik bir kayıp yaşandığı belirlenmiştir. Rosmarinik asit açısından B grubu'nun verimliliği, S grubuna göre üstün bulunmuştur.

Ana bileşenler arasında tespit edilen ve üçüncü sırada en çok bulunan fenolik bileşik rutin olarak tespit edilmiştir. A grubunda rutin ortalama değeri 30,15 mg/g ekstre olarak bulunmuştur. B grubunda 23,18 mg/g ekstre olarak tespit edilmiş ve %25 kayıp olduğu görülmüştür. S grubunda rutin değeri 10,59 mg/g ekstre olarak bulunmuş ve %65 değer kaybı olduğu tespit edilmiştir.

Gallik asit miktarı, A grubunda ortalama değer olarak 0,09 mg/g ekstre olarak bulunmuştur. B grubunda ortalama değer 5 kat daha yüksek olup 0,57 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir. S grubunda ise gallik asit ortalama değeri yaklaşık 9 kat artarak 0,84 mg/g ekstre olarak belirlenmiştir. Oransal olarak S grubunda en çok artışı görülen fenolik bileşik gallik asit olarak tespit edilmiştir.

Naringenin miktarı A grubunda ortalama değer olarak 0,67 mg/g ekstre olarak bulunmuştur. B grubunda ise 2,81 mg/g ekstre olarak tespit edilmiş ve yaklaşık 5 kat arttığı belirlenmiştir.

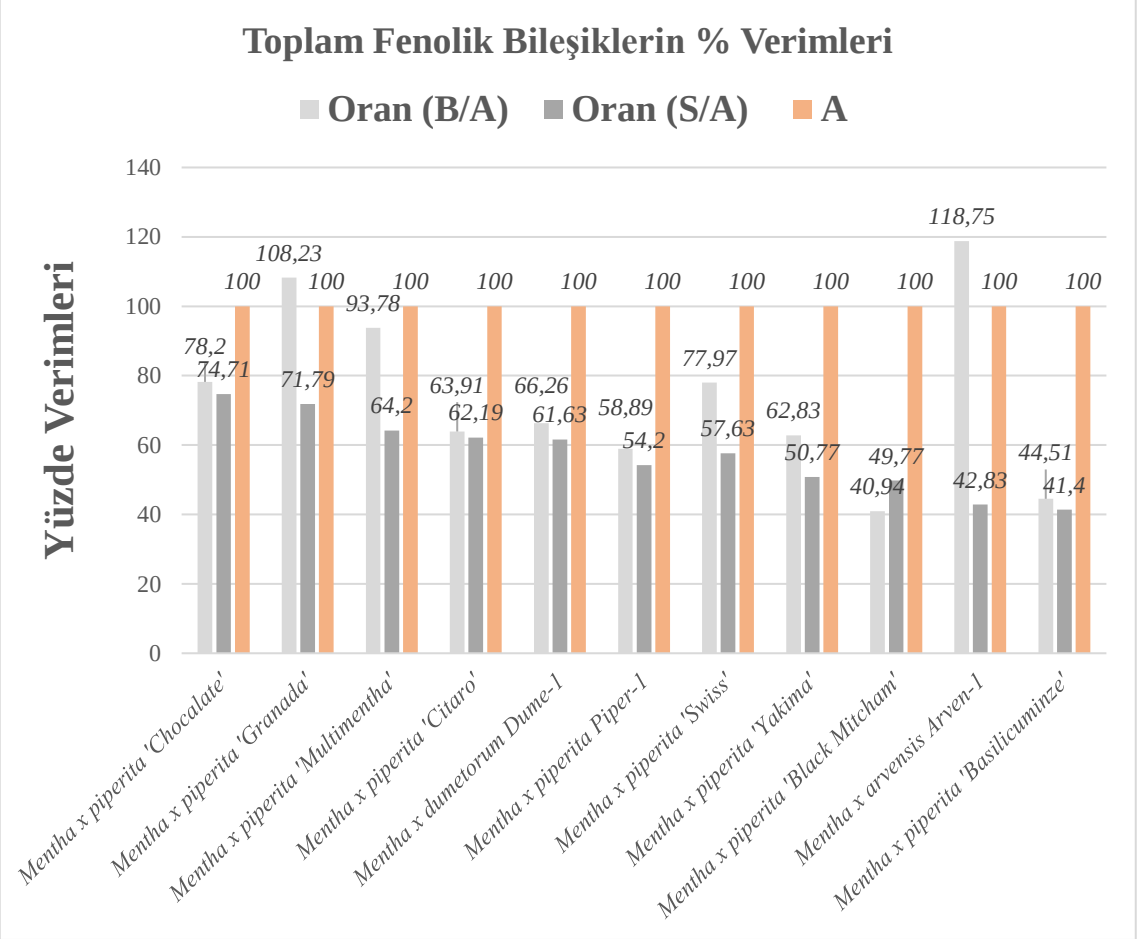
Kuersetin ortalama değeri, A grubunda 0,26 mg/g ekstre olarak bulunmuş, B grubunda ortalama değer 2,08 mg/g ekstre olarak tespit edilmiş ve 8 kat artış tespit edilmiştir. B grubunda en çok artış gösteren fenolik bileşikler naringenin ve kuersetin olarak tespit edilmiştir. Tablo 5.1 'de B ve S ekstraksiyon gruplarının A grubu ekstrelerine karşı fenolik bileşik miktarlarındaki değişim gösterilmektedir.

Tablo 5.1: Ekstraksiyon Gruplarının Fenolik Bileşiklerinin Kayıp-Kazanç % Verimleri

Fenolik Bileşik	**A (mg/g ekstre)**	**B (mg/g ekstre)**	**S (mg/g ekstre)**
Galik Asit	0,09	0,57 (+533% kazanç)	0,84 (+833% kazanç)
Klorojenik Asit	-	-	-
Kafeik Asit	-	-	-
p-Kumarik Asit	-	-	-
Kuersetin	0,26	2,08 (+700% kazanç)	-
Naringenin	0,67	2,81 (+319% kazanç)	-
Eriositrin	471,65	283,43 (-40% kayıp)	287,37 (-40% kayıp)
Rutin	30,15	23,18 (-23% kayıp)	10,59 (-65% kayıp)
Rozmarinik Asit	135,09	101,23 (-25% kayıp)	73,71 (-45% kayıp)

Ekstraksiyon gruplarındaki fenolik bileşik farklılıkları incelendikten sonra. Nane türleri tek tek incelenmiş katı kalıntı ekstreleri ve atık su ekstreleri'nin etanol ekstresine göre ne kadar kayıp/kazanç yaşadıkları tespit edilmiştir. *Mentha x piperita* 'Granada' ve *Mentha arvensis* katı atık ekstresinde fenolik bileşikler açısından kayıp değil kazanç mevcuttur. Bu durum sıcaklık sonrası hidrolize olan tanen bileşiklerinden fenolik asitlerin oluşması ile açıklanabilir. Hem B hem S de en düşük fenolik bileşik

kaybının en az yaşandığı ilk *Mentha* türü *Mentha x piperita* 'Chocolate' dır. B grubunda %78,20 ve S grubunda %74,71 verimlilik ile fenolik bileşikleri yüksek oranda korudugu tespit edilmiştir. *Mentha x piperita* 'Granada' ve *Mentha x piperita* 'Multimentha' bu sıralama da 2. ve 3. Olarak tespit edilmiştir. En yüksek fenolik bileşik kayıpları sırasıyla *Mentha x piperita* 'Basilicuminze', *Mentha x piperita* 'Black mitcham' *ve Mentha x piperita* 'Yakima' da yaşanmıştır. (Şekil 5.1)



Şekil 5. 1: *Mentha* Türlerinin Farklı Ekstrelerde Fenolik Bileşik Kayıp-Kazanç % Verimleri

11 Farklı Nane türünün farklı ekstraksiyon gruplarında nasıl antioksidan aktivite gösterdiği incelenmiştir. ABTS•+ metodunda katı kalıntı ve atık su ekstreleri incelendiğinde en yüksek antioksidan aktivite. *Mentha x piperita* 'Citaro' katı atık kalıntı ekstresinde tespit edilmiş 4.06 IC_{50} değeri tespit edilmiştir. Bunu 4.13 IC_{50}

değeri ile *Mentha x piperita* 'Swiss' katı atık ekstresi takip etmiştir. IC_{50} değerleri A, B ve S gruplarına bakıldığında 6,27 ortalama IC_{50} değeri ile en yüksek antioksidan aktivite B grubunda gözlemlenmiştir. Yapılan korelasyon analizin de herhangi bir fenolik bileşik ile ABTS•+ testi B grubunda korelasyon rastlanmamıştır. B grubunda yüksek antioksidan aktivite göstermesi naringenin, kuersetin ve galik Asit miktarlarının diğer gruplardan daha yüksek olmasından kaynaklı olabilir.

DPPH• methodunun oluşturduğu antioksidan aktivite tayinine bakıldığı zaman A grubunda yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir, B grubunda A grubundan yaklasık %10 daha az olmakla birlikte, yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. B grubunda naringeninle antioksidan aktivite arasında korelasyon bulunmuştur. S grubunda antioksidan aktivite azalmıştır.

FRAP metodunun antioksidan aktivite tayinleri incelendiğin de etanol ekstrelerinin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Mentha x piperita* 'Chocolate'. *Mentha x piperita* 'Citaro', *Mentha x piperita* 'Black mitcham', nane türleri S grubunda en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Ferrulik asit ile FRAP yöntemi B grubu arasında yüksek korelasyon bulunmuştur. *Mentha x dumetorum, Mentha arvensis, Mentha x piperita* 'Multimentha' nane türleri S grubunda yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Rutin ve eriositrin ile FRAP yöntemi S grubu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

Mentha türlerinin, CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayin yönteminin katı kalıntı ve atık su ekstrelerinde göstermiş olduğu antioksidan aktivite incelenmiş, Her nane türünde atık su ekstresinde daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. Özyürek ve ark., yapmış olduğu çalışmada belirlenen fenolik bileşiklerin hangisinin CUPRAC yönteminde daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmeye çalışmışlardır.HPS-CUPRAC yöntemiyle ilgili olarak "HPS değeri (%)" ifadesi, HPS (hidrofilik polifenol standartları) kullanılarak CUPRAC yöntemine göre ölçülen toplam antioksidan kapasitesinin yüzdesel bir değeri anlamına gelir. Bu, belirli bir numunenin antioksidan kapasitesinin HPS-CUPRAC yöntemi ile değerlendirilmiş hali olup, sonuçların yüzdelik olarak ifade edilmiştir. Yüzde Hesaplama işlemi, Numunenin absorbans değeri, HPS standart eğrisi kullanılarak yüzdesel bir HPS değerine dönüştürülür. Bu, numunenin toplam antioksidan kapasitesinin HPS-CUPRAC yöntemiyle ölçülmüş halidir. HPS değeri (%), belirli bir

numunenin HPS-CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasitesini ifade eder ve bu kapasitenin yüzdesel olarak ne kadar olduğunu gösterir. Bu değer, antioksidan aktivitenin ne kadar güçlü olduğunu ve numunenin antioksidan kapasitesinin standart hidrofilik polifenollerle kıyaslandığında nasıl bir performans gösterdiğini anlamak için kullanılır. Gallik Asit: Hem yüksek hız sabiti (3,55 × 10^12) hem de en yüksek HPS değeri (62,8 ± 0,9 %) ile öne çıkmaktadır. Bu, onun güçlü bir indirgeme kapasitesine sahip olduğunu ve suda çözünür polifenol olarak diğer bileşenlere göre en yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirtir (293).

S grubunun fenolik bileşiklerini incelediğimiz de A grubuna oranla yaklaşık 9 kat fazla gallik asit içerdiği tespit edilmiştir. Özyürek ve ark. yapmış olduğu çalışma ile sonuclar uyumlu gözlenmiştir (293). CUPRAC metodu A, B ve S gruplarında herhangi bir fenolik bileşikle korelasyon göstermemiştir.

Katı kalıntı ekstrelerinin yani B grubunda kuersetin molekülünün yüksek bulunması değerlendirilmiştir, Rutin, bir flavonoid türüdür ve kimyasal olarak ısıya maruz kaldığında hidrolize olabilir. Bu hidroliz reaksiyonu sonucunda, rutin molekülü parçalanarak çeşitli bileşiklere dönüşebilir. Bu dönüşümlerden biri, rutinin hidrolizi sonucu kuersetin oluşumudur. Kuersetin, rutin molekülünün hidroliz ürünlerinden biridir ve bir flavonol bileşiğidir. Rutin, kuersetin ve şeker molekülleri ile oluşmuştur, rutin de bunlar arasındaki bağın hidrolizi sonucu kuersetin elde edilir. Bu hidroliz işlemi, genellikle yüksek sıcaklık ve asidik koşullar altında gerçekleşir. Bu dönüşüm, özellikle gıda işleme ve hazırlığı sırasında meydana gelebilir. Örneğin, çay yaprakları gibi bitkisel materyallerin kaynatılması veya çeşitli gıda maddelerinin işlenmesi sırasında rutinin hidrolizi ve kuersetine dönüşümü gerçekleşebilir. Bu süreç, rutinin biyoyararlılığını ve etkisini etkileyebilir, çünkü kuersetin genellikle rutine göre daha kolay emilir ve biyolojik etkilere sahiptir.

Rutinin de-glikozilasyonu, flavonoidlerin biyolojik aktivitelerini artırmak için önemli bir süreç olabilir. Yang ve ark. yaptığı çalışmada, rutinin asit işlemi ile de-glikozilasyonu, iki farklı çözücü ve asit konsantrasyonu kullanılarak rutinin kuersetine'e hidrolizinin karşılaştırılmasıyla araştırılmıştır. Antioksidan aktivite, kimyasal yöntemler kullanılarak ölçülmüş ve biyolojik aktiviteler hücre tabanlı sistemlerde incelenmiştir. Rutin hidrolizi, tepki çözücüsü olarak %80 etanol kullanıldığında (suya kıyasla), hidroliz oranı artmış ve asit konsantrasyonları arttıkça

hidroliz hızı hızlanmıştır. Rutinin, %80 etanoldeki 0,5 M HCl ile 3 saatlik reaksiyonlarında, neredeyse tüm rutin kuersetin'e dönüştürülmüştür. Bu çalışma, glikozit flavonoidlerin de-glikozilasyonunun fizyolojik aktiviteyi artırabileceğini ve bu nedenle çeşitli alanlarda kullanımını artırabileceğini önermektedir. Uçucu yağ eldesi sırasında ısıya maruz kalan *Mentha* türlerinin katı atıklarının EtOH ekstresinde, *Mentha* türlerinin EtOH ekstresi ile kıyaslandığında kuersetin değerininin artması ve rutin değerinin azalması ısı artışının Rutin hidrolizasyonunu artırdığını kanıtlamıştır (294).

Isı ile beraber eriositrindeki glikozidik bağın kopması sonucu rhamnozidin eriositrinden ayrılması sonucun da, naringenin e benzer eridictiol oluşur, Eridictiolda ki B halkasından bir OH grubunun uzaklasmasıyla naringinine dönüşmüş olabilir. Bunun ısıdan kaynaklı mı enzim kaynaklı bir sebepten mi kaynaklandığı ilerideki çalışmalarda gösterilmesi gerekir. eriositrinden naringenin oluşumu, genellikle bir enzimatik hidroliz süreciyle gerçekleşir. Bu hidroliz reaksiyonu, çeşitli enzimler veya uygun asit veya bazlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Naringenin değerinin Atık ürünler de yüksek çıkması bu şekilde açıklanabilir.

Mentha x piperita 'Granada' ve *Mentha arvensis, Mentha* türleri katı kalıntı atıklarında etanol ekstresine göre artmış fenolik içerik olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak Nane türlerinde yer alan yüksek tanen içeriklerinin sıcaklık, enzim vb. Sebeplerden dolayı hidrolize olarak fenolik bileşik oluşturmuş olabileceği öngörülmektedir.

Kim ve ark., yapmış olduğu çalışmada taze tanik asidin termal hidrolizi, kapalı bir reaktörde dört farklı sıcaklıkta (65, 100, 150 ve 200 °C) gerçekleştirildi. Sistemdeki basınçlar, sırasıyla 150 ve 200 °C'de 1,3 ve 4,8 MPa'ya ulaştı. Hidroliz ürünleri (galik asit ve pirogallol), HPLC ile tespit edildi ve miktarı belirlendi. Hidrolize tanik asidin basit termal işlemesi, artırılmış antioksidan ve antimikrobiyal kapasiteye sahip galik asit ve pirogallol üretmek için kullanılabilir. gallik asitten çeşitli reaksiyonlar sonucu rosmarinik asit oluşabileceği öngörülmektedir. B ve S de gallik asit artışı mevcut, bu artış tanen yıkımına bağlı olabileceği değerlendirilmiştir (295).

Berktaş ve ark., nane distilasyonunun yan ürünleri üzeine çalışma yapmışlardır, biyoaktif bileşiklerin değerlendirilmesinde dikkate alınmamıştır. Bu

çalışmada, nane yan ürünleri olan hidrodistilasyon sonrası hydrosol ve damıtılmış yapraklar incelenmiştir. Nane damıtılmış yaprakları, etil asetat ve etanol ile ardışık ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Eriositrin'in HPLC analizleri ve toplam fenolik analizi, hydrosolün 2 saatlik hidrodistilasyon sonrasında önemli miktarda fenol içerdiğini göstermiştir. Hidrodistilasyonun 1 ila 2 saat uzatılması fenolik içerik üzerinde önemsiz etkilere sahiptir. Nane damıtılmış yaprakları, sırasıyla 1 ve 2 saatlik etil asetat ekstraksiyonunda 7,39 ve 7,19 g/100 mL ekstrakt verimi sağlamıştır. Nane'nin baskın fenolü (eriositrin), 1 saatlik damıtımdan sonra hidrosolde 917,5 mg/g ekstre idi. Nane'nin 4 saatlik damıtılması, eriositrin miktarında azalmaya neden olmuştur, ancak hidrosol değerli miktarda fenol içermiştir (840,1 mg/g ekstre) (211). Bu çalışmada hidrodistilasyon süresinin artması *Mentha* türlerinin kimyasal içeriklerinin azalması kanıtlanmıştır. Çalışmamız her bir *Mentha* ekstresi için sabit süre kullanıldığı için sürenin etkisi hesaplanmamıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamız da 9 farklı *Mentha x piperita* L. Kultivarı, *Mentha arvensis* ve *Mentha x dumetorum* nane türlerinin %70 lik etanol ekstreleri elde edilmiş ve bu ekstreler A grubu olarak adlandırılmıştır. Tüm nane türleri 16 farklı fenolik bileşik açısından HPLC kullanılarak değerlendirilmeye alınmış 11 farklı fenolik bileşikte anlamlı pikler oluşmuş ve değenlendirilmeye alınmıştır. *M. arvensis,* incelen fenolik bileşiklerin toplam değerleri açısından incelenmiş 47,33 mg/g ekstre değeri ile en düşük seviye fenolik içerik taşıyan nane türü olarak tespit edildi. *M. arvensis,* kendisine en yakın nane türünden 10 kat daha fazla kafeik asit içererek en yüksek kafeik asit içeriğine sahiptir. Ayrıca, *M. arvensis*, kendisine en yakın nane türünden 3 kat daha fazla naringenin içererek en yüksek naringenin içeriğine sahiptir. *Mentha x piperita* L. çeşitlerinin içerdikleri fenolik bileşikler ilk kez gösterilmiştir. Çeşitlerin ana bileşeni eriositrin olarak tespit edildi, bunu rosmarinik asit ve rutin takip etti. Çeşitler arasında en yüksek fenolik içeriğe 953,41 mg/g ekstre ile *Mentha x piperita* 'Citaro' sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunu 942,53 mg/g ekstre toplam fenolik bileşik içeriği ile *Mentha x piperita* 'Black mitcham' takip etmiştir. 861,49 mg/g ekstre fenolik madde içeriği ile *Mentha x piperita* 'Swiss' üçüncü sırada yer almıştır. 0,192 mg/g ekstre gallik asit miktarı ile nane türleri arasından en yüksek gallik asit içeriğine *Mentha x dumetorum* Schult. Sahiptir.

Antioksidan aktivitelerini tayin edebilmek için 4 farklı metot kullanılmıştır. ABTS•+, DPPH•, CUPRAC ve FRAP yöntemleri ile *Mentha* türlerinin antioksidan aktiviteleri ölçülmüştür. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri tek tek değerlendirildiğinde *M. piperita* 'Yakima' her yöntem de yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Daha sonra en yüksek aktiviteyi tüm testler de *M. piperita* 'Swiss' olarak tespit edilmiştir. Bunları *M. piperita* 'Citaro', *M. piperita* 'Granada' olarak takip etmiştir. *Mentha x piperita* 'Yakima' nın yüksek antioksidan aktivite göstermesi, rosmarinik asit, apigenin-7-glucoside ve kuersetin seviyelerinin yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Pearson R Korelasyon analizin de FRAP ve ABTS•+ methodları rosmarinik asit ve apigenin ile yüksek korelasyon bulunmuştur. *Mentha x piperita* 'Swiss' çeşitinde yüksek eriositrin, rosmarinik asit, rutin ve apigenin miktarı içerdiği tespit edilmiştir. DPPH• metodunda eriositrin ve rutin ile yüksek korele bulunmuştur. FRAP ve ABTS•+ metodun da rosmarinik asit ve apigenin güçlü ilişki

bulunması *M. piperita* 'Swiss' kultivarının fenolik bileşiklerinin antioksidan aktiviteye katkısını desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmada ikinci aşama olarak uçucu yağ eldesi sonrasında katı kalıntı materyalinin %70 lik Etanol çözeltisi ile hazırlanan ekstresi; bu grup 'B grubu' olarak adlandırılmıştır. Atık su özütü 'S grubu' olarak adlandırılmıştır. B ve S olarak adlandırılan kalıntı materyallerinin fenolik bileşikleri ve antioksidan kapasiteleri ölçülmüştür.

Fenolik bileşiklerin değerlendirilmesin de nane türlerinin katı kalıntı ve atık su ekstreleri'nin, *Mentha* etanol ekstresine göre ne kadar kayıp yaşadığını tespit edilmiştir. *Mentha x piperita* 'Granada' ve *Mentha arvensis* katı atık ekstresinde fenolik bileşikler açısından kayıp değil kazanç mevcuttur. Bu durum sıcaklık sonrası hidrolize olan tanen bileşiklerinden fenolik asitlerin oluşması ile açıklanabilir. Hem B hem S de en düşük fenolik bileşik kaybının en az yaşandığı ilk *Mentha* türü *Mentha x piperita* 'Chocolate' dır. B grubunda %78,20 ve S grubunda %74,71 verimlilik ile fenolik bileşikleri yüksek oranda korudugu tespit edilmiştir. *Mentha x piperita* 'Granada', *Mentha x piperita* 'Multimentha' *ve Mentha x piperita* 'Citaro' bu sıralama da 2.,3. ve 4. olarak tespit edilmiştir. En yüksek fenolik bileşik kayıpları sırasıyla *Mentha x piperita* 'Basilicuminze', *Mentha x piperita* 'Black mitcham' *ve Mentha x piperita* 'Yakima' da yaşanmıştır.

Kalıntı materyaller üzerine 4 farklı antioksidan aktivite tayini uygulanmıştır. ABTS•+ metodunda IC_{50} değerleri A, B ve S gruplarına bakıldığında 6,27 µg/mL ortalama IC_{50} değeri ile en yüksek antioksidan aktivite B grubunda gözlemlenmiştir. Yapılan korelasyon analizin de herhangi bir fenolik bileşik ile ABTS•+ testi ile B grubunda korelasyon rastlanmamıştır. B grubunun yüksek antioksidan aktivite göstermesi naringenin, kuersetin ve gallik asit miktarlarının diğer gruplardan daha yüksek olmasından kaynaklı olabilir. DPPH• methodunun oluşturduğu antioksidan aktivite tayinine bakıldığı zaman A grubunda yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir, B grubunda A grubundan yaklasık %10 daha az olmakla birlikte, yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. S grubunda DPPH• yöntemin de antioksidan aktivite azalmıştır. CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayin yönteminde her nane türünde atık su ekstresinde daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. Gallik Asit: Hem yüksek hız sabiti ($3{,}55 \times 10^{12}$) hem de en yüksek HPS değeri (62,8

± 0,9 %) ile öne çıkmaktadır. Bu, onun güçlü bir indirgeme kapasitesine sahip olduğunu ve suda çözünür polifenol olarak diğer bileşenlere göre yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirtir (293). S grubunun fenolik bileşiklerini incelediğimiz de A grubuna oranla yaklaşık 9 kat fazla gallik asit içerdiği tespit edilmiştir. Özyürek ve ark. yapmış olduğu çalışma ile sonuclarımız uyumlu gözlenmiştir.

Farklı *Mentha* türleri üzerine yaptığımız çalışmada, *Mentha* türleri ve tür içi varyetelerinin kimyasal bileşenleri hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır. Yüksek eriositrin ve yüksek toplam fenolik içeriği ile *Mentha x piperita* 'Black mitcham*'*, *Mentha x piperita* 'Citaro' ve *Mentha x piperita* 'Swiss' ilk üç nane türü olarak dikkat çekmektedir. Antioksidan aktivite tayin yöntemlerine genel bir bakışla bakıldığın da, *Mentha x piperita* 'Yakima*'* her yöntem de yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Daha sonra en yüksek aktiviteyi tüm testler de *Mentha x piperita* 'Swiss' olarak tespit edilmiştir. Bunları *Mentha x piperita* 'Citaro', *Mentha x piperita* 'Granada' takip etmiştir. Hem kimyasal içeriği hem farklı antioksidan aktivite yöntemlerinde yüksek aktivite göstermesi ile *Mentha x piperita* 'Citaro' ve *Mentha x piperita* 'Swiss' dikkat çekmektedir. Bu nane türlerinin farklı kimyasallar ve yöntemler ile yapılmış ekstrelerinin analizinin gerçekleştirilmesi ve çeşitli in vitro, in vivo çalışmalarla desteklenmesi. Klinik kullanımları hakkında ileri gelişmeler oluşturacaktır.

Uçucu yağ eldesi sonrası kalıntı materyalin korumuş oldukları içerikler incelendiğin de *Mentha arvensis* ve *Mentha x piperita* 'Granada*'* B ve S grupları için dikkat çeken oranlara sahipti. Bu iki *Mentha* türünün katı kalıntı ekstrelerinde fenolik bileşilklerinde artış saptanmıştır. *Mentha arvensis Mentha* türleri arasından en düşük toplam fenolik içeriğe sahiptir ancak kafeik asit ve naringenin bileşikleri açısından en yüksek içeriğe sahipti. Ayrıca *Mentha x piperita* 'Granada*'* diğer *Mentha* türlerinden farklı olarak uçucu yağının ana bileşenin linalool ve linalil asetat olması lavanta uçucu yağı yerine farklı bir alternatif sunmaktadır. Bu *Mentha* türü ile lavanta türlerinin uçucu yağ verimlilikleri, kimyasal benzerlikleri, farkları ve ucucu yağ eldesi sonrası kalıntı atıkların fitokimyasal analizlerinin incelenmesine yönelik çalışmalar önem arz etmektedir.

Hem B hem de S gruplarında fenolik bileşik kaybının en az yaşandığı ilk *Mentha* türü, *Mentha x piperita* 'Chocolate' olarak belirlenmiştir. Bu tür, B grubunda %78,20 ve S grubunda %74,71 verimlilik ile fenolik bileşikleri yüksek oranda

korumuştur. *Mentha x piperita* 'Granada' ve *Mentha x piperita* 'Multimentha' ise bu sıralamada ikinci ve üçüncü olarak yer almıştır. En yüksek fenolik bileşik kayıpları ise sırasıyla *Mentha x piperita* 'Basilicuminze', *Mentha x piperita* 'Black mitcham' *ve Mentha x piperita* 'Yakima' çeşitlerinde gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, fenolik bileşik kayıplarının türler arasında büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Fenolik bileşik kayıpları az olan *Mentha* türlerinin, farklı distilasyon yöntemleri ve distilasyon süreleri kullanılarak elde edilen uçucu yağ verimlerinin belirlenmesi, katı kalıntı ve atık su kısımlarının fitokimyasal analizlerinin yapılması, bu çalışmanın sunduğu bilgileri daha da ileriye taşıyacaktır. Bu tür analizler, sadece fenolik bileşiklerin korunumu açısından değil, aynı zamanda bu bileşiklerin ticari ve endüstriyel potansiyelleri açısından da önemli veriler sağlayacaktır. Özellikle, uçucu yağ eldesi sonrası kalan katı ve sıvı atıkların değerlendirilmesi, bu atıkların eczacılık, kozmetik ve diğer sektörlerde katma değerli ürünlere dönüştürülmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır. Böylece, bu *Mentha* türlerinin tam potansiyellerinin ortaya çıkarılması ve sürdürülebilir kullanım stratejilerinin geliştirilmesi sağlanacaktır. Bu çalışmalar, gelecekte yapılacak araştırmalara da önemli bir temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Antonii Laurentii de Jussieu (1789). genera plantarum.
2. De Judicibus M. Botanical notebook. UoM Custom Book Centre; Printed by Custom Book Centre, University of Melbourne, March 2010 Australia. 2011. 232 p.
3. Lawrence B.M. Mint: the genus *Mentha*. Medicinal and aromatic plants -industrial profiles. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL; 2007.
4. Khaliq, F. A. & Mushtaq, A. *The Five Most Traded Compounds Worldwide: Importance, Opportunities, and Risks*. *IJCBS* vol. 23 www.iscientific.org/Journal.html (2023).
5. Ludwiczuk, A., Kiełtyka-Dadasiewicz, A., Sawicki, R., Golus, J. & Ginalska, G. *Essential Oils of Some Mentha Species and Cultivars, Their Chemistry and Bacteriostatic Activity*.
6. Dorman, H. D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y., & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(16), 4563-4569.
7. Triantaphyllou, G. , D. boskou, K. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. Int. J. Food Sci. Nutr. 52, 4, 313–317. 2001.
8. Kapp, K. Polyphenolic and essential oil composition of *Mentha* and their antimicrobial effect. Faculty Pharm. Univ. Helsinki 2015, 1–73.2015. .
9. Areias, F. M., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., & Seabra, R. M. (2001). Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food chemistry*, *73*(3), 307-311.
10. Başer, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B., Özek, T. & Tarimcilar, G. Essential oils of *Mentha* species from Marmara region of Turkey. *Journal of Essential Oil Research* **24**, 265–272 (2012).
11. Santana-Méridas, O., González-Coloma, A., & Sánchez-Vioque, R. (2012). Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry reviews*, *11*, 447-466.
12. Liang, J., Lu, Q., Lerner, R., Sun, X., Zeng, H., & Liu, Y. (2011). Agricultural wastes. *Water Environment Research*, *83*(10), 1439-1466.
13. Giray, F. H. ,. An analysis of world lavender oil markets and lessons for Turkey. J. Essent. Oil-Bearing Plants 21, 1612–1623. https://doi.org/10.1080/ 0972060X.2019.1574612. 2018. .
14. Politi, M., Menghini, L., Conti, B., Bedini, S., Farina, P., Cioni, P. L., ... & De Leo, M. (2020). Reconsidering hydrosols as main products of aromatic plants manufactory: The lavandin (Lavandula× intermedia) case study in Tuscany. *Molecules*, *25*(9), 2225.
15. Zhu, G. Y., Xiao, Z. B., Zhou, R. J., Niu, Y. W., Yi, F. P., & Zhu, J. C. (2012). The utilization of aromatic plant waste resource. *Advanced Materials Research*, *518*, 3561-3565.
16. Wollinger, A., Perrin, É., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from Rosmarinus officinalis L. leaves determined by DPPH• assays. *Comptes Rendus. Chimie*, *19*(6), 754-765.
17. Navarrete, A., Herrero, M., Martín, A., Cocero, M. J., & Ibáñez, E. (2011). Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of Food Engineering*, *104*(2), 196-201.
18. Guerreiro, O., Alves, S. P., Soldado, D., Cachucho, L., Almeida, J. M., Francisco, A., ... & Jerónimo, E. (2020). Inclusion of the aerial part and condensed tannin extract from Cistus ladanifer L. in lamb diets–Effects on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular and subcutaneous fat. *Meat science*, *160*, 107945.
19. Nieto, G., Estrada, M., Jordán, M. J., Garrido, M. D., & Bañón, S. (2011). Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions. *Food Chemistry*, *124*(4), 1423-1429.
20. Asensio-S.-Manzanera, M. C., Martín, H., Sanz, M. A., & Herrero, B. (2010, August). Antioxidant activity of Lavandula latifolia, Salvia lavandulifolia and Thymus mastichina collected in Spain. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and 925* (pp. 281-290).
21. Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in food science & technology*, *17*(9), 505-512.
22. Méndez-Tovar, I., Herrero, B., Pérez-Magariño, S., Pereira, J. A., & Manzanera, M. C. A. S. (2015). By-product of Lavandula latifolia essential oil distillation as source of antioxidants. *journal of food and drug analysis*, *23*(2), 225-233.
23. Moisa, C., Copolovici, L., Bungau, S., Pop, G., Imbrea, I., Lupitu, A., ... & Copolovici, D. (2018). Wastes resulting from aromatic plants distillation-bio-sources of antioxidants and phenolic compounds with biological active principles. *Farmacia*, *66*(1), 289-295.
24. Chizzola, R., Michitsch, H., & Franz, C. (2008). Antioxidative properties of Thymus vulgaris

leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(16), 6897-6904.
25. Hassouni, A. E., Bachiri, A. E., & Belbachir, C. (2019). Lavandula dentata solid residue from essential oil industry. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *22*(6), 1601-1613.
26. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(23), 6882-6890.
27. Alves-Ferreira, J., Duarte, L. C., Fernandes, M. C., Pereira, H., & Carvalheiro, F. (2019). Hydrothermal treatments of Cistus ladanifer industrial residues obtained from essential oil distilleries. *Waste and biomass valorization*, *10*, 1303-1310.
28. Lesage-Meessen, L., Bou, M., Ginies, C., Chevret, D., Navarro, D., Drula, E., ... & Lomascolo, A. (2018). Lavender-and lavandin-distilled straws: an untapped feedstock with great potential for the production of high-added value compounds and fungal enzymes. *Biotechnology for biofuels*, *11*, 1-13.
29. Rout, P. K., Nannaware, A. D., & Rajasekharan, R. (2015). *U.S. Patent No. 9,199,956*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
30. Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, *72*(2), 145-171.
31. Slavov, A., Denev, P., Panchev, I., Shikov, V., Nenov, N., Yantcheva, N., & Vasileva, I. (2017). Combined recovery of polysaccharides and polyphenols from Rosa damascena wastes. *Industrial Crops and Products*, *100*, 85-94.
32. Lee, C. J., Chen, L. G., Chang, T. L., Ke, W. M., Lo, Y. F., & Wang, C. C. (2011). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food chemistry*, *124*(3), 833-841.
33. Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S. M., & Ghorbani, A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *4*(2), 63-79.
34. Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R., & Bakhrouf, A. (2009). Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha* longifolia and *Mentha* pulegium) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, 2227-2238.
35. Bramley, G. L., Forest, F., & de Kok, R. P. (2009). Troublesome tropical mints: re-examining generic limits of Vitex and relations (Lamiaceae) in South East Asia. *Taxon*, *58*(2), 500-510.
36. APweb[1].
37. G. Erdtman. *Svensk Botanisk Tidskrift Utgiven Av Svenska Botaniska Föreningen Redigerad Av HÄFTE 3*. (1952).
38. Raj, B. (1983). A contribution to the pollen morphology of Verbenaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, *39*(3-4), 343-422.
39. Harley, R. M., Atkins, S., Budantsev, A. L., Cantino, P. D., Conn, B. J., Grayer, R., ... & Upson, T. (2004). Labiatae. In *Flowering plants· Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)* (pp. 167-275). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
40. Thorne, R. F. (1992). Classification and geography of the flowering plants. *The botanical review*, *58*, 225-327.
41. Moon, H. K., Vinckier, S., Smets, E. & Huysmans, S. Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **275**, 93–108 (2008).
42. Sutour, S. (2010). Study of the chemical composition of essential oils and extracts of mints from Corsica and Kumquants. *Doctorat thesis in organic and analytical chemistry. University of Corsica*.
43. Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (longifolia L. and viridis) essential oils. *Journal of food science*, *74*(7), M358-M363.
44. Abbaszadeh, B., Valadabadi, S. A., Farahani, H. A., & Darvishi, H. H. (2009). Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. *African Journal of Plant Science*, *3*(10), 217- 221.

45. Fatih, B., Madani, K., Chibane, M. & Duez, P. Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species. in *Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature* (InTech, 2017). doi:10.5772/67291.
46. Šarić-Kundalić, B., Fialová, S., Dobeš, C., Ölzant, S., Tekeľová, D., Grančai, D., ... & Saukel, J. (2009). Multivariate numerical taxonomy of *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Scientia Pharmaceutica*, *77*(4), 851-876.
47. Tyler, V. E., Brady, L. R., & Robbers, J. E. (1988). Pharmacognosy. 9th edit. *Lea and Fabiger, Philadelphia*.
48. Singh, R., Shushni, M. A., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha* piperita L. *Arabian Journal of Chemistry*, *8*(3), 322-328.
49. Beigi, M., Torki-Harchegani, M., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2018). Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha*× piperita L.) leaves under different drying methods. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 267-276.
50. Herro, E., & Jacob, S. E. (2010). *Mentha* piperita (peppermint). *DERM*, *21*(6), 327-329.
51. Briggs, C. Peppermint: Medicinal herb and flavoring agent. Canadian Pharmaceutical Journal, 126, 89–92.(1993).
52. Foster, S. Peppermint: *Mentha* piperita. American Botanical Council—Botantical Series, 306, 3–8.(1996). .
53. Hoffman, D. The complete illustrated holistic herbal. Rockport, MA: Element Books Inc. (1996). .
54. Fleming, T. *PDR for Herbal Medicines. Montvale, NJ: Medical Economics Company, Inc. (1998).* .
55. Schmidt, E., Bail, S., Buchbauer, G., Stoilova, I., Atanasova, T., Stoyanova, A., ... & Jirovetz, L. (2009). Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of essential oil from *Mentha* x piperita. *Natural product communications*, *4*(8), 1934578X0900400819.
56. Bradley, P. R. (1992). British herbal compendium: a handbook of scientific information on widely used plant drugs/published by the British Herbal Medicine Association and produced by its Scientific Committee. *Bournemouth, Dorset: The Association*.
57. ESCOP. *Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs. Exeter, England: Fascicule 5. Devon, European Scientific Cooperative on Phytotherapy.(1997).* .
58. Khayyal, M. T., Seif-El-Nasr, M., El-Ghazaly, M. A., Okpanyi, S. N., Kelber, O., & Weiser, D. (2006). Mechanisms involved in the gastro-protective effect of STW 5 (Iberogast®) and its components against ulcers and rebound acidity. *Phytomedicine*, *13*, 56-66.
59. Schilcher, H. Phytotherapy in Paediatrics: Handbook for Physicians and Pharmacists. Medpharm scientific publishers, Stuttgart; 4647-4656.(1997).
60. AYAR-KAYALİ, Hulya, Urek, R. O., Nakiboglu, M., & Tarhan, L. (2009). Antioxidant activities of endemic Sideritis leptoclada and *Mentha* dumetorum aqueous extracts used in Turkey folk medicine. *Journal of food processing and preservation*, *33*(3), 285-295.
61. Tarimcilar, G., & Kaynak, G. (1997). A new record for the Flora of Turkey. *Lagascalia*, *20*(1), 113-115.
62. Clapham, A. R. and Warburg. E. F. Flora of British Isles. Cambridge Univ. Press, London, 730 p.I960.
63. Schultes, J. A. Observations botanicae in Linnaei species Plantarium. ex. ed. C. L. Willdenow Denipouti. p. lOK. 1809. .
64. Londonkar, R. L., & Poddar, P. V. (2009). Studies on activity of various extracts of *Mentha* arvensis Linn against drug induced gastric ulcer in mammals. *World journal of gastrointestinal oncology*, *1*(1), 82.
65. Kapoor LD, K. R. Advances in Essential Oil in Industry. New Delhi: Today and Tomor-rows Printers and Publishers; 1997.
66. Trease GE, E. W. *Pharmacognosy. 12th Ed. London: Balliere Tindal; 1983.*
67. CB, H., Aishwarya, B., Roopa, D., Kumar, R., & Bharathi, D. R. (2022). A contemporary review on pharmacognosy and pharmacological activities of *Mentha* arvensis. *International Journal of Pharmacognosy and Chemistry*, 107-112.
68. Kumar, A., Khajuria, V., & Aggarwal, S. (2012). Secondary metabolites of *Mentha* arvensis and their biological activities. *Analytical Chemistry Letters*, *2*(6), 373-400.
69. do Nascimento, E. M. M., Rodrigues, F. F. G., Campos, A. R., & da Costa, J. G. M. (2009). Phytochemical prospection, toxicity and antimicrobial activity of *Mentha* arvensis (Labiatae) from northeast of Brazil. *Journal of Young Pharmacists*, *1*(3), 210.
70. Nair, R., & CHANDA, S. (2007). Antibacterial activities of some medicinal plants of the western

region of India. *Turkish Journal of Biology*, *31*(4), 231-236.
71. Farooq Anwar, F. A., Alkharfy, K. M., Najeeb-ur-Rehman, N. U. R., Adam, E. H. K., & Anwar-ul-Hassan Gilani, A. U. H. G. (2017). Chemo-geographical variations in the composition of volatiles and the biological attributes of *Mentha* longifolia (L.) essential oils from Saudi Arabia.
72. Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, *2*(4), 152-159.
73. Saba, I., & Anwar, F. (2018). Effect of harvesting regions on physico-chemical and biological attributes of supercritical fluid-extracted spearmint (*Mentha* spicata L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *21*(2), 400-419.
74. Irshad, S., Butt, M., & Younus, H. (2011). In-vitro antibacterial activity of two medicinal plants neem (Azadirachta indica) and peppermint. *Int Res J Pharma*, *1*(01), 9-14.
75. Mahady, G. B., Pendland, S. L., Stoia, A., Hamill, F. A., Fabricant, D., Dietz, B. M., & Chadwick, L. R. (2005). In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *19*(11), 988-991.
76. Preeti Dixit, P. D. (2013). A comparative screening of antibacterial activity of Anisomeles indica with *Mentha* piperita against human pathogenic micro-organisms.
77. Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, *88*(2), 308-316.
78. Ed-Dra, A., Filai, F. R., Bou-Idra, M., Zekkori, B., Bouymajane, A., Moukrad, N., ... & Bentayeb, A. (2018). Application of *Mentha* suaveolens essential oil as an antimicrobial agent in fresh turkey sausages. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, *6*(1), 7-12.
79. Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., & Cañigueral, S. (2001). Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *76*(1), 93-98.
80. Fortes, T. O., Alviano, D. S., Tupinambá, G., Padrón, T. S., Antoniolli, Â. R., Alviano, C. S., & Seldin, L. (2008). Production of an antimicrobial substance against Cryptococcus neoformans by Paenibacillus brasilensis Sa3 isolated from the rhizosphere of Kalanchoe brasiliensis. *Microbiological Research*, *163*(2), 200-207.
81. Saba, I., & Anwar, F. (2018). Effect of harvesting regions on physico-chemical and biological attributes of supercritical fluid-extracted spearmint (*Mentha* spicata L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *21*(2), 400-419..
82. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(11), 1827-1836.
83. Džamić, A. M., Soković, M. D., Ristić, M. S., Novaković, M., Grujić-Jovanović, S., Tešević, V., & Marin, P. D. (2010). Antifungal and antioxidant activity of *Mentha* longifolia (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica serbica*, *34*(1), 57-61.
84. Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B., & Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, *69*(05), 413-419.
85. Samber, N., Khan, A., Varma, A., & Manzoor, N. (2015). Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha* piperita essential oil and its major components. *Pharmaceutical biology*, *53*(10), 1496-1504.
86. Tullio, V., Roana, J., Scalas, D., & Mandras, N. (2019). Evaluation of the antifungal activity of *Mentha* x piperita (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) essential oil and its synergistic interaction with azoles. *Molecules*, *24*(17), 3148.
87. Ling, H., Chen, B., Kang, A., Lee, J. M., & Chang, M. W. (2013). Transcriptome response to alkane biofuels in Saccharomyces cerevisiae: identification of efflux pumps involved in alkane tolerance. *Biotechnology for biofuels*, *6*, 1-10.
88. Ferreira, P., Cardoso, T., Ferreira, F., Fernandes-Ferreira, M., Piper, P., & Sousa, M. J. (2014). *Mentha* piperita essential oil induces apoptosis in yeast associated with both cytosolic and mitochondrial ROS-mediated damage. *FEMS yeast research*, *14*(7), 1006-1014.
89. da Cruz Almeida, E. T., de Souza, G. T., de Sousa Guedes, J. P., Barbosa, I. M., de Sousa, C. P., Castellano, L. R. C., ... & de Souza, E. L. (2019). *Mentha* piperita L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food microbiology*, *82*, 20-29.
90. Melzer, J., Rösch, W., Reichling, J., Brignoli, R., & Saller, R. (2004). Meta-analysis: phytotherapy of functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *20*(11-12), 1279-1287.

91. McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (Matricaria recutita L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *20*(7), 519-530.
92. Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., MORI, H., OTAKE, T., UEDA, N., ... & NAKANISHI, T. (1998). Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *21*(8), 829-833.
93. Amzazi, S., Ghoulami, S., Bakri, Y., Idrissi, A. I., Fkih-Tétouani, S., & Benjouad, A. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 inhibitory activity of *Mentha* longifolia. *Therapies*, *58*(6), 531-534.
94. Schuhmacher, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. J. P. V. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*, *10*(6- 7), 504-510.
95. Clurman, B. E., & Roberts, J. M. (1995). Cell cycle and cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *87*(20), 1499-1501.
96. Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, *3*(10), 768-780.
97. Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *66*(6), 1192- 1308.
98. Ochwang'i, D. O., Kimwele, C. N., Oduma, J. A., Gathumbi, P. K., Mbaria, J. M., & Kiama, S. G. (2014). Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. *Journal of ethnopharmacology*, *151*(3), 1040-1055.
99. Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, *6*(10), 4103.
100. Gull, T., Anwar, F., Sultana, B., Alcayde, M. A. C., & Nouman, W. (2015). Capparis species: A potential source of bioactives and high-value components: A review. *Industrial crops and products*, *67*, 81-96.
101. Farooq Anwar, F. A., Gulzar Muhammad, G. M., Hussain, M. A., Zengin, G., Alkharfy, K. M., Muhammad Ashraf, M. A., & Gilani, A. H. (2016). Capparis spinosa L.: a plant with high potential for development of functional foods and nutraceuticals/pharmaceuticals.
102. Sivaraj, R., Rahman, P. K., Rajiv, P., Narendhran, S., & Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of Acalypha indica mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *129*, 255-258.
103. Fouché, G., Cragg, G. M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V. J., & Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of ethnopharmacology*, *119*(3), 455- 461.
104. Manson, M. M. (2003). Cancer prevention–the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in molecular medicine*, *9*(1), 11-18.
105. Fridlender, M., Kapulnik, Y., & Koltai, H. (2015). Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Frontiers in plant science*, *6*, 163161.
106. Rahimifard, N., HAJI, M. H., Hedayati, M. H., BAGHERI, O., Pishehvar, H., & Ajani, Y. (2010). Cytotoxic effects of essential oils and extracts of some *Mentha* species on Vero, Hela and Hep2 cell lines.
107. Fatemeh, H., & Vida, H. (2012). Down regulation of matrix metalloproteinases by spearmint extract in Wehi-164 cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(39).
108. Patti, F., Palmioli, A., Vitalini, S., Bertazza, L., Redaelli, M., Zorzan, M., ... & Pezzani, R. (2020). Anticancer effects of wild mountain *Mentha* longifolia extract in adrenocortical tumor cell models. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1647.
109. OHARA, A., & MATSUHISA, T. (2002). Anti-tumor promoting activities of edible plants against okadaic acid. *Food Science and Technology Research*, *8*(2), 158-161.
110. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(11), 1827-1836.
111. Al-Ali, K., Abdelrazik, M., Alghaithy, A., Diab, A., El-Beshbishy, H., & Baghdadi, H. (2014). Antimutagenic and anticancer activity of Al Madinah Alhasawy mint (*Mentha* longifolia) leaves extract. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, *17*(12), 1231-1236.
112. Shirazi, F. H., Ahmadi, N., & Kamalinejad, M. (2004). Evaluation of northern Iran *Mentha* pulegium L. cytotoxicity. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, *12*(3), 106-110.

113. Jain, D., Pathak, N., Khan, S., Raghuram, G. V., Bhargava, A., Samarth, R., & Mishra, P. K. (2011). Evaluation of cytotoxicity and anticarcinogenic potential of *Mentha* leaf extracts. *International Journal of Toxicology*, *30*(2), 225-236.

114. Kelkawi, A. H. A., Abbasi Kajani, A., & Bordbar, A. K. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Mentha* pulegium and investigation of their antibacterial, antifungal and anticancer activity. *IET nanobiotechnology*, *11*(4), 370-376.

115. Banerjee, P. P., Bandyopadhyay, A., Harsha, S. N., Policegoudra, R. S., Bhattacharya, S., Karak, N., & Chattopadhyay, A. (2017). *Mentha* arvensis (Linn.)-mediated green silver nanoparticles trigger caspase 9-dependent cell death in MCF7 and MDA-MB-231 cells. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 265-278.

116. Faridi, U., Dhawan, S. S., Pal, S., Gupta, S., Shukla, A. K., Darokar, M. P., ... & Shasany, A. K. (2016). Repurposing L-menthol for systems medicine and cancer therapeutics? L-menthol induces apoptosis through caspase 10 and by suppressing HSP90. *Omics: a journal of integrative biology*, *20*(1), 53-64.

117. Kebede, T., Gadisa, E., & Tufa, A. (2021). Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. *PloS one*, *16*(3), e0249253.

118. Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, *19*, e01585.

119. Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med aromat plants*, *4*(196), 2167-0412.

120. Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, *194*, 135-142.

121. Cittan, M., Altuntaş, E., & Çelik, A. (2018). Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in Tilia cordata fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method. *Industrial crops and products*, *122*, 553-558.

122. Paz, J. E. W., Contreras, C. R., Munguía, A. R., Aguilar, C. N., & Inungaray, M. L. C. (2018). Phenolic content and antibacterial activity of extracts of Hamelia patens obtained by different extraction methods. *Brazilian journal of microbiology*, *49*, 656-661.

123. Chanda, S. V., & Kaneria, M. J. (2012). Optimization of conditions for the extraction of antioxidants from leaves of Syzygium cumini L. using different solvents. *Food Analytical Methods*, *5*, 332-338.

124. Mahmudati, N., Wahyono, P., & Djunaedi, D. (2020, June). Antioxidant activity and total phenolic content of three varieties of Ginger (Zingiber officinale) in decoction and infusion extraction method. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1567, No. 2, p. 022028). IOP Publishing.

125. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *11*, 12-17.

126. Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., Safari, M., Askari, G., & Salami, M. (2019). Microwave-assisted extraction of hempseed oil: Studying and comparing of fatty acid composition, antioxidant activity, physiochemical and thermal properties with Soxhlet extraction. *Journal of food science and technology*, *56*, 4198-4210.

127. Kryževičiūtė, N., Kraujalis, P., & Venskutonis, P. R. (2016). Optimization of high pressure extraction processes for the separation of raspberry pomace into lipophilic and hydrophilic fractions. *The Journal of Supercritical Fluids*, *108*, 61-68.

128. Bagade, S. B., & Patil, M. (2021). Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: a review. *Critical reviews in analytical chemistry*, *51*(2), 138-149.

129. Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, *13*(2), 105-113.

130. Taşkın, B., & Aksoylu Özbek, Z. (2020). Optimisation of microwave effect on bioactives contents and colour attributes of aqueous green tea extracts by central composite design. *Journal of Food*

Measurement and Characterization, *14*(4), 2240-2252.
131. Hu, B., Xi, X., Li, H., Qin, Y., Li, C., Zhang, Z., ... & Luo, Q. (2021). A comparison of extraction yield, quality and thermal properties from Sapindus mukorossi seed oil between microwave assisted extraction and Soxhlet extraction. *Industrial Crops and Products*, *161*, 113185.
132. Ismail-Suhaimy, N. W., Gani, S. S. A., Zaidan, U. H., Halmi, M. I. E., & Bawon, P. (2021). Optimizing Conditions for Microwave-Assisted Extraction of Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Barleria lupulina Lindl. *Plants*, *10*(4), 682..
133. Fernández-Marín, R., Fernandes, S. C., Andrés, M. A., & Labidi, J. (2021). Microwave-assisted extraction of curcuma longa l. Oil: Optimization, chemical structure and composition, antioxidant activity and comparison with conventional soxhlet extraction. *Molecules*, *26*(6), 1516.
134. Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, *5*, 409-424.
135. Machado, A. P. D. F., Sumere, B. R., Mekaru, C., Martinez, J., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2019). Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode. *International journal of food science & technology*, *54*(9), 2792-2801.
136. González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., &Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (Vitis vinifera L.)–A response surface approach. *Ultrasonics sonochemistry*, *21*(6), 2176-2184.
137. Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q. (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from Sparganii rhizoma with response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, *20*(3), 846-854.
138. Bimakr, M., Ganjloo, A., Zarringhalami, S., & Ansarian, E. (2017). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from Malva sylvestris leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Science and Biotechnology*, *26*, 1481-1490.
139. Quintero Quiroz, J., Naranjo Duran, A. M., Silva Garcia, M., Ciro Gomez, G. L., & Rojas Camargo, J. J. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from annatto seeds, evaluation of their antimicrobial and antioxidant activity, and identification of main compounds by LC/ESI-MS analysis. *International journal of food science*, *2019*(1), 3721828.
140. Thakker, M. R., Parikh, J. K., & Desai, M. A. (2018). Ultrasound assisted hydrotropic extraction: a greener approach for the isolation of geraniol from the leaves of Cymbopogon martinii. *ACS sustainable chemistry & engineering*, *6*(3), 3215-3224.
141. Raja, P. M. V. , & B. A. R. Basic principles of supercritical fluid chromatography and supercrtical fluid extraction. Retrieved May 11, 2021, from https://chem.libretexts.org/@go/page/55864.
142. Belo, Y. N., Al-Hamimi, S., Chimuka, L., & Turner, C. (2019). Ultrahigh-pressure supercritical fluid extraction and chromatography of Moringa oleifera and Moringa peregrina seed lipids. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *411*, 3685-3693.
143. Rosas-Quina, Y. E., & Mejía-Nova, F. C. (2021). Supercritical fluid extraction with cosolvent of alkaloids from Lupinus mutabilis Sweet and comparison with conventional method. *Journal of Food Process Engineering*, *44*(4), e13657.
144. Zhang, H., Li, Q., Qiao, G., Qiu, Z., Wen, Z., & Wen, X. (2020). Optimizing the supercritical carbon dioxide extraction of sweet cherry (Prunus avium L.) leaves and UPLC-MS/MS analysis. *Analytical methods*, *12*(23), 3004-3013.
145. Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., & Bahramifar, N. (2004). Comparison of essential oil composition of Carum copticum obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, *86*(4), 587-591.
146. de Andrade Lima, M., Andreou, R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2021). Supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from potato (Solanum tuberosum) peels. *Applied sciences*, *11*(8), 3410.
147. Vági, E., Balázs, M., Komoczi, A., Mihalovits, M., & Szekely, E. (2020). Fractionation of phytocannabinoids from industrial hemp residues with high-pressure technologies. *The Journal of Supercritical Fluids*, *164*, 104898.
148. Saha, A., & Basak, B. B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, *145*, 111979
149. Kassama, L. S., Shi, J., & Mittal, G. S. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Separation and Purification Technology*, *60*(3), 278-284.
150. Pellicanò, T. M., Sicari, V., Loizzo, M. R., Leporini, M., Falco, T., & Poiana, M. (2019).

Optimizing the supercritical fluid extraction process of bioactive compounds from processed tomato skin by-products. *Food Science and Technology*, *40*, 692-697.
151. Prasad, K. N., Yang, B., Shi, J., Yu, C., Zhao, M., Xue, S., & Jiang, Y. (2010). Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 471-477.
152. Ferrentino, G., Giampiccolo, S., Morozova, K., Haman, N., Spilimbergo, S., & Scampicchio, M. (2020). Supercritical fluid extraction of oils from apple seeds: Process optimization, chemical characterization and comparison with a conventional solvent extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *64*, 102428.
153. Calderón-Oliver, M., & Ponce-Alquicira, E. (2021). Environmentally friendly techniques and their comparison in the extraction of natural antioxidants from green tea, rosemary, clove, and oregano. *Molecules*, *26*(7), 1869.
154. Marina Alegre, M. L., Plaza del Moral, M., & Domínguez Rodríguez, G. (2021). Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (Prunus avium L.) pomace.
155. Macedo, G. A., Santana, Á. L., Crawford, L. M., Wang, S. C., Dias, F. F., & de Moura Bell, J. M. (2021). Integrated microwave-and enzyme-assisted extraction of phenolic compounds from olive pomace. *Lwt*, *138*, 110621.
156. Heemann, A. C. W., Heemann, R., Kalegari, P., Spier, M. R., & Santin, E. (2019). Extração de polifenóis de erva-mate verde assistida por enzimas. *Brazilian Journal of Food Technology*, *22*, e2017222.
157. Curren, M. S., & King, J. W. (2001). Ethanol-modified subcritical water extraction combined with solid-phase microextraction for determining atrazine in beef kidney. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(5), 2175-2180.
158. Kovačević, D. B., Barba, F. J., Granato, D., Galanakis, C. M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., & Putnik, P. (2018). Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *Food chemistry*, *254*, 150-157.
159. Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (Thymus vulgaris). *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(44), 10920-10929.
160. Erşan, S., Üstündağ, Ö. G., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2018). Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (Pistacia vera L.) hulls. *Food chemistry*, *253*, 46-54.
161. Loarce, L., Oliver-Simancas, R., Marchante, L., Díaz-Maroto, M. C., & Alañón, M. E. (2020). Implementation of subcritical water extraction with natural deep eutectic solvents for sustainable extraction of phenolic compounds from winemaking by-products. *Food Research International*, *137*, 109728.
162. Cassel, E., Vargas, R. M. F., Martinez, N., Lorenzo, D., & Dellacassa, E. (2009). Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial crops and products*, *29*(1), 171-176.
163. Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of food Engineering*, *90*(3), 409-413.
164. Naves, Y. R. ,. Technologie et Chimie des Parfums Naturels. Masson, Paris. 1974.
165. Dugo, G. , D. G. A. *The Genus Citrus. Taylor Francis Publishing, London.2002.* .
166. Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, *53*(4), 771-782.
167. Modey, W. K., Mulholland, D. A., & Raynor, M. W. (1996). Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*, *7*(1), 1-15.
168. Eikani, M. H., Goodarznia, I., & Mirza, M. (1999). Supercritical carbon dioxide extraction of cumin seeds (Cuminum cyminum L.). *Flavour and Fragrance Journal*, *14*(1), 29-31.
169. Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification ofanthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, *14*(6), 767-778.
170. Zhang, H. F., Yang, X. H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(12), 672-688.
171. Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and

analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *373*, 23-30.
172. Sahraoui, N., Vian, M. A., Bornard, I., Boutekedjiret, C., & Chemat, F. (2008). Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils: Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, *1210*(2), 229-233.
173. Rezzoug, S. A., Boutekedjiret, C., & Allaf, K. (2005). Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *Journal of food engineering*, *71*(1), 9-17.
174. Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(2), 161-169.
175. Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science and Technology*, *89*(1), 83-98.
176. Riera, E., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., Blasco, M., & Mulet, A. (2004). Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, *11*(3-4), 241-244.
177. Denny, E. F. K., & Lawrence, B. M. (2007). The distillation of mint oils: History, current theory, and practice. *Mint: The genus Mentha*, 185-216.
178. Zheljazkov, V. D., & Astatkie, T. (2012). Distillation waste water can modify peppermint (*Mentha*× piperita L.) oil composition. *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 420-426.
179. de Elguea-Culebras, G. O., Bravo, E. M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market–A review. *Industrial Crops and Products*, *175*, 114261.
180. Saha, A., & Basak, B. B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, *145*, 111979.
181. Sánchez-Vioque, R., Izquierdo-Melero, M. E., Quílez, M., Herraiz-Peñalver, D., Santana-Méridas, O., & Jordán, M. J. (2018). Solid residues from the distillation of Salvia lavandulifolia Vahl as a natural source of antioxidant compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *95*(10), 1277-1284.
182. Méndez-Tovar, I., Herrero, B., Pérez-Magariño, S., Pereira, J. A., & Manzanera, M. C. A. S. (2015). By-product of Lavandula latifolia essential oil distillation as source of antioxidants. *journal of food and drug analysis*, *23*(2), 225-233.
183. Gavarić, N., Kladar, N., Mišan, A., Nikolić, A., Samojlik, I., Mimica-Dukić, N., & Božin, B. (2015). Postdistillation waste material of thyme (Thymus vulgaris L., Lamiaceae) as a potential source of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, *74*, 457-464.
184. El-Guendouz, S., Aazza, S., Anahi Dandlen, S., Majdoub, N., Lyoussi, B., Raposo, S., ... & Graça Miguel, M. (2019). Antioxidant activity of thyme waste extract in O/W emulsions. *Antioxidants*, *8*(8), 243.
185. Veličković, D. T., Milenović, D. M., Ristić, M. S., & Veljković, V. B. (2008). Ultrasonic extraction of waste solid residues from the Salvia sp. essential oil hydrodistillation. *Biochemical Engineering Journal*, *42*(1), 97-104.
186. de Elguea-Culebras, G. O., Sánchez-Vioque, R., Santana-Méridas, O., Herraiz-Peñalver, D., Carmona, M., & Berruga, M. I. (2016). In vitro antifungal activity of residues from essential oil industry against Penicillium verrucosum, a common contaminant of ripening cheeses. *LWT*, *73*, 226-232.
187. Vasileva, I., Denkova, R., Chochkov, R., Teneva, D., Denkova, Z., Dessev, T., ... & Slavov, A. (2018). Effect of lavender (Lavandula angustifolia) and melissa (Melissa Officinalis) waste on quality and shelf life of bread. *Food Chemistry*, *253*, 13-21.
188. Yantcheva, N. S., Vasileva, I. N., Denev, P. N., Lutova, P. V., Mitov, S. E., Iordanova, Z. A., ... & Slavov, A. M. (2017). Valorization of waste of Calendula officinalis—obtaining of ethanol extracts. *Bulg Chem Commun*, *49*, 21-25.
189. Greff, B., Lakatos, E., Szigeti, J., & Varga, L. (2021). Co-composting with herbal wastes: Potential effects of essential oil residues on microbial pathogens during composting. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *51*(5), 457-511.
190. Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328-2375.
191. Carrión-Paladines, V., Fries, A., Gómez-Muñoz, B., & García-Ruiz, R. (2016). Agrochemical characterization of vermicomposts produced from residues of Palo Santo (Bursera graveolens) essential oil extraction. *Waste management*, *58*, 135-143.

192. Grigoriadou, K., Krigas, N., Lazari, D., & Maloupa, E. (2020). Sustainable use of mediterranean medicinal-aromatic plants. In *Feed additives* (pp. 57-74). Academic Press.
193. Zaccardelli, M., Roscigno, G., Pane, C., Celano, G., Di Matteo, M., Mainente, M., ... & De Falco, E. (2021). Essential oils and quality composts sourced by recycling vegetable residues from the aromatic plant supply chain. *Industrial Crops and Products*, *162*, 113255.
194. Ratiarisoa, R. V., Magniont, C., Ginestet, S., Oms, C., & Escadeillas, G. (2016). Assessment of distilled lavender stalks as bioaggregate for building materials: Hygrothermal properties, mechanical performance and chemical interactions with mineral pozzolanic binder. *Construction and Building Materials*, *124*, 801-815.
195. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, *5*, e47.
196. Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res*, *5*(31), 6697-6703.
197. Jimenez-Lopez, C., Fraga-Corral, M., Carpena, M., García-Oliveira, P., Echave, J., Pereira, A. G., ... & Simal-Gandara, J. (2020). Agriculture waste valorisation as a source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bioeconomy. *Food & function*, *11*(6), 4853-4877.
198. Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by- products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *49*, 96-109.
199. Baiano, A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes—A review. *Molecules*, *19*(9), 14821-14842.
200. Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *16*(2), 295-315.
201. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, *4*, 200-214.
202. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, *99*(1), 191-203.
203. Celano, R., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Roscigno, G., Campone, L., De Falco, E., ... & Rastrelli, L. (2017). Oil distillation wastewaters from aromatic herbs as new natural source of antioxidant compounds. *Food Research International*, *99*, 298-307.
204. Navarrete, A., Herrero, M., Martín, A., Cocero, M. J., & Ibáñez, E. (2011). Valorization of solid wastes from essential oil industry. *Journal of Food Engineering*, *104*(2), 196-201.
205. Librán, C. M., Moro, A., Zalacain, A., Molina, A., Carmona, M., & Berruga, M. I. (2013). Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing. *World journal of microbiology and biotechnology*, *29*, 1179-1188.
206. Naviglio, D., Pizzolongo, F., Ferrara, L., Aragon, A., & Santini, A. (2008). Extraction of pure lycopene from industrial tomato by-products in water using a new high-pressure process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(14), 2414-2420.
207. Baydar, N. G., & Baydar, H. (2013). Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (Rosa damascena Mill.) extracts. *Industrial Crops and Products*, *41*, 375-380.
208. Sánchez-Vioque, R., Izquierdo-Melero, M. E., Polissiou, M., Astraka, K., Tarantilis, P. A., Herraiz-Peñalver, D., ... & Santana-Méridas, O. (2015). Comparative chemistry and biological properties of the solid residues from hydrodistillation of Spanish populations of Rosmarinus officinalis L. *Grasas y Aceites*, *66*(2), e079-e079.
209. Alexa, E., Danciu, C., Radulov, I., Obistioiu, D., Sumalan, R. M., Morar, A., & Dehelean, C. A. (2018). Phytochemical screening and biological activity of *Mentha*× piperita L. and Lavandula angustifolia Mill. extracts. *Analytical Cellular Pathology*, *2018*(1), 2678924.
210. Oreopoulou, A., Papavassilopoulou, E., Bardouki, H., Vamvakias, M., Bimpilas, A., & Oreopoulou, V. (2018). Antioxidant recovery from hydrodistillation residues of selected Lamiaceae species by alkaline extraction. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, *8*, 83-89.
211. Berktas, S., & Cam, M. (2021). Peppermint leaves hydrodistillation by-products: Bioactive properties and incorporation into ice cream formulations. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(11), 4282-4293.
212. Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2012).

Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (Thymus vulgaris). *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(44), 10920-10929.

213. Schweigert, N., Zehnder, A. J., & Eggen, R. I. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals: minireview. *Environmental microbiology*, *3*(2), 81-91.

214. Drinić, Z., Pljevljakušić, D., Živković, J., Bigović, D., & Šavikin, K. (2020). Microwave-assisted extraction of O. vulgare L. spp. hirtum essential oil: Comparison with conventional hydro-distillation. *Food and Bioproducts Processing*, *120*, 158-165.

215. Rusanova, M., Rusanov, K., Butterweck, V., & Atanassov, I. (2019). Exploring the capacity of endophytic fungi isolated from medicinal plants for fermentation and phenolics biotransformation of rose oil distillation wastewater. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *33*(1), 651-663.

216. Ollanketo, M., Peltoketo, A., Hartonen, K., Hiltunen, R., & Riekkola, M. L. (2002). Extraction of sage (Salvia officinalis L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *European Food Research and Technology*, *215*, 158-163.

217. Rao, B. R. (2013). Hydrosols and water-soluble essential oils: Medicinal and biological properties. *Recent Progress in Medicinal Plants, Essential oils I; Govil, JN, Bhattacharya, S., Eds*, 119-140.

218. Celano, R., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Roscigno, G., Campone, L., De Falco, E., ... & Rastrelli, L. (2017). Oil distillation wastewaters from aromatic herbs as new natural source of antioxidant compounds. *Food Research International*, *99*, 298-307.

219. Wedler, J., Rusanov, K., Atanassov, I., & Butterweck, V. (2016). A polyphenol-enriched fraction of rose oil distillation wastewater inhibits cell proliferation, migration and TNF-α-induced VEGF secretion in human immortalized keratinocytes. *Planta medica*, *82*(11/12), 1000-1008.

220. Zheljazkov, V. D., & Astatkie, T. (2012). Distillation wastewater can modify peppermint (*Mentha*× piperita L.) oil composition. *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 420-426.

221. Nahar, L., & Sarker, S. D. (2019). *Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry*. John Wiley & Sons.

222. Firn, R. *Nature's Chemicals. Oxford University Press, Oxford. Pp 74-75. (2010)*. .

223. Madziga, H. A., Sanni, S., & Sandabe, U. K. (2010). Phytochemical and elemental analysis of Acalypha wilkesiana leaf. *Journal of American Science*, *6*(11), 510-514.

224. Kar, A. (2007). Pharmaocgnosy and Pharmacobiotechnology (Revised-Expanded Second Edition). *New Age International LimtedPublishres New Delhi*, 332-600.

225. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Ammann, S., Oksman-Caldentey, K. M., & Buchert, J. (2008). Enzyme-assisted processing increases antimicrobial and antioxidant activity of bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(3), 681-688.

226. Martinez, M. J. A., Lazaro, R. M., Del Olmo, L. M. B., & Benito, P. B. (2008). Anti-infectious activity in the anthemideae tribe. *Studies in Natural Products Chemistry*, *35*, 445-516.

227. Pliego, A. B., Tavakoli, M., Khusro, A., Seidavi, A., Elghandour, M. M., Salem, A. Z., ... & Rene Rivas-Caceres, R. (2022). Beneficial and adverse effects of medicinal plants as feed supplements in poultry nutrition: A review. *Animal Biotechnology*, *33*(2), 369-391.

228. Pereira, E., Pimenta, A. I., Calhelha, R. C., Antonio, A. L., Verde, S. C., Barros, L., ... & Ferreira, I. C. (2016). Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of Thymus vulgaris L. and *Mentha* x piperita L. *LWT-Food Science and Technology*, *71*, 370-377.

229. Voirin, B., Bayet, C., Faure, O., & Jullien, F. (1999). Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha* aquatica, M. citrata, M. spicata and M. x piperita. *Phytochemistry*, *50*(7), 1189-1193.

230. Choudhury, R. P., Kumar, A., & Garg, A. N. (2006). Analysis of Indian mint (*Mentha* spicata) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(3), 825-832.

231. Kızıl, S., Hasımı, N., Tolan, V., Kılınc, E., & Yuksel, U. (2010). Mineral content, essential oil components and biological activity of two *Mentha* species (M. piperita L., M. spicata L.). *Turkish Journal of Field Crops*, *15*(2), 148-153..

232. Maffei, M. (1992). Fatty acid variability in some *Mentha* species. *Biochemical systematics and ecology*, *20*(6), 573-582..

233. Pérez, M. G. F., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., & Reynoso- Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha* piperita) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, *156*, 273-278.

234. Aggarwal, B. B., & Kunnumakkara, A. B. (Eds.). (2009). *Molecular targets and therapeutic uses of spices: modern uses for ancient medicine*. World Scientific.

235. Ertaş, A., Gören, A. C., Haşimi, N., Tolan, V., & Kolak, U. (2015). Evaluation of antioxidant, cholinesterase inhibitory and antimicrobial properties of *Mentha* longifolia subsp. noeana and its secondary metabolites. *Records of Natural Products*, *9*(1).

236. Raju, M., Varakumar, S., Lakshminarayana, R., Krishnakantha, T. P., & Baskaran, V. (2007). Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry*, *101*(4), 1598-1605.

237. Dambrauskienė, E., Viškelis, P., & Karklelienė, R. (2008). Productivity and biochemical composition of *Mentha* piperita L. of different origin. *biologija*, *54*(2).

238. Riachi, L. G., & De Maria, C. A. (2015). Peppermint antioxidants revisited. *Food chemistry*, *176*, 72-81.

239. Padmini, E., Valarmathi, A., & Rani, M. U. (2010). Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha* spicata and Camellia sinensis. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, *1*(4), 772-781.

240. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.

241. Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., ... & Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-biological interactions*, *188*(2), 334-339.

242. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, *4*(8), 118.

243. Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *TRENDS in Neurosciences*, *27*(10), 595-600..

244. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, *2*(2), 219-236..

245. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *39*(1), 44-84.

246. Victor, V. M., Rocha, M., & De la Fuente, M. (2004). Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International immunopharmacology*, *4*(3), 327-347.

247. Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, *75*(2), 199-212.

248. Van den Ende, W., Peshev, D., & De Gara, L. (2011). Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(12), 689-697.

249. Ray, R., & Shah, A. M. (2005). NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*, *109*(3), 217-226.

250. Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants–quo vadis?. *Trends in pharmacological sciences*, *32*(3), 125-130..

251. Blaise, G. A., Gauvin, D., Gangal, M., & Authier, S. (2005). Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*, *208*(2), 177-192.

252. Amber, K. T., Shiman, M. I., & Badiavas, E. V. (2014). The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity. *Integrative cancer therapies*, *13*(1), 38-45.

253. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The plant cell*, *17*(7), 1866-1875.

254. Ofor, I. B., Obeagu, E. I., Ochei, K. C., & Odo, M. (2016). Evaluation of Superoxide Dismutase, Glutathione, Vitamins C, E and Trace Element Status in Prostate Cancer Patients in Orlu Teaching Hospital, Imo State. *Int. J. Curr. Res. Chem. Pharm. Sci*, *3*(2), 29-44.

255. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, *52*(8), 253-

265.

256. Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., De Castro, J., Espinosa, E., Redondo, A., ... & González-Barón, M. (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes & Control*, *15*, 707-719.

257. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(10), 4290-4302.

258. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH•, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, *19*(6-7), 669-675.

259. Balasundram, N., Tan, Y. A., Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Samman, S. (2005). Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, *14*(4), 319.

260. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, *97*(4), 654-660.

261. Iqbal, S., Bhanger, M. I., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food chemistry*, *93*(2), 265-272.

262. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(6), 1619-1624.

263. Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH• free radical method. *Phytotherapy research*, *15*(2), 127-130.

264. Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. Swiss *medical weekly*, *142*(3334), w13659-w13659.

265. Barja, G. (2014). The mitochondrial free radical theory of aging. *Progress in molecular biology and translational science*, *127*, 1-27.

266. Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current medicinal chemistry*, *19*(31), 5319-5341.

267. Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition*, *64*(3), S112-S120.

268. Oh, J., Jo, H., Cho, A. R., Kim, S. J., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food control*, *31*(2), 403-409.

269. Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In *Food antioxidants* (pp. 1-18). Dordrecht: Springer Netherlands.

270. Guenther, E. The Essential Oils, Vol.1, Robert E. Krieger Publishing Company, Florida (1972) .

271. McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha* piperita L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *20*(8), 619-633.

272. Bhattia, H. N., & Hanifa, R. H. M. A. (2011). Adsorptive removal of chromium ions from synthetic effluents by *Mentha* arvensis biomass: kinetic and equilibrium modeling. *International Journal*, *2*(4).

273. Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha* arvensis) and lemon grass (Cymbopogon flexuosus) against human pathogenic fungi. *Pharmaceutical Biology*, *41*(6), 421-425.

274. Harada, T., Kagamihara, Y., Tanaka, S., Sakamoto, K., & Oku, A. (1992). A highly convergent asymmetric synthesis of the C (19)-C (27) segment of rifamycin S: an application of enantiodifferentiating acetalization with menthone. *The Journal of Organic Chemistry*, *57*(6), 1637-1639.

275. Helmig, D., Ortega, J., Duhl, T., Tanner, D., Guenther, A., Harley, P., ... & Sakulyanontvittaya, T. (2007). Sesquiterpene emissions from pine trees− identifications, emission rates and flux estimates for the contiguous United States. *Environmental science & technology*, *41*(5), 1545- 1553.

276. S. Arctander. (1994). Perfume and Flavor Chemicals (Aroma Chemicals) (Carol Stream, IL. IL: Allured Publishing Company.

277. López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M. J., & Jäger, A. K. (2017). Exploring pharmacological mechanisms of lavender (Lavandula angustifolia) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 280.

278. Ford, R. A., Domeyer, B., Easterday, O., Maier, K., & Middleton, J. (2000). Criteria for development of a database for safety evaluation of fragrance ingredients. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *31*(2), 166-181.

279. Koşar, M., Dorman, H. D., Can Başer, K. H., & Hiltunen, R. (2004). Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(16), 5004-5010.

280. Dorman, H. D., Koşar, M., Başer, K. H. C., & Hiltunen, R. (2009). Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha* x piperita L.(peppermint) extracts. *Natural product communications*, *4*(4), 1934578X0900400419.

281. Bittner Fialová, S., Kurin, E., Trajčíková, E., Jánošová, L., Šušaníková, I., Tekeľová, D., ... & Mučaji, P. (2020). *Mentha* rhizomes as an alternative source of natural antioxidants. *Molecules*, *25*(1), 200.

282. Cam, M., Basyigit, B., Alasalvar, H., Yilmaztekin, M., Ahhmed, A., Sagdic, O., ... & Telci, I. (2020). Bioactive properties of powdered peppermint and spearmint extracts: Inhibition of key enzymes linked to hypertension and type 2 diabetes. *Food Bioscience*, *35*, 100577.

283. Aksit, H., Çelik, S. M., Sen, Ö., Erenler, R., Demirtas, I., Telci, İ., & Elmastas, M. (2014). Complete isolation and characterization of polar portion of *Mentha* dumetorum water extract. *Records of Natural Products*, *8*(3), 277.

284. Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., ... & Raal, A. (2013). Commercial peppermint (*Mentha*× piperita L.) teas: Antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food research international*, *53*(2), 758-766.

285. Park, Y. J., Baek, S. A., Choi, Y., Kim, J. K., & Park, S. U. (2019). Metabolic profiling of nine *Mentha* species and prediction of their antioxidant properties using chemometrics. *Molecules*, *24*(2), 258.

286. Kaur, H., Tandon, R., Kalia, A., & Maini, C. (2018). Chemical composition and antifungal activity of essential oils from aerial parts of *Mentha* piperita and *Mentha* arvensis. *Int. J. Pharmacol*, *5*, 767-773.

287. Ayar-Kayali, Hulya, Urek, R. O., Nakiboglu, M., & Tarhan, L. (2009). Antioxidant activities of endemic Sideritis leptoclada and *Mentha* dumetorum aqueous extracts used in Turkey folk medicine. *Journal of food processing and preservation*, *33*(3), 285-295.

288. Nickavar, B., Alinaghi, A., & Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(3), 203-209.

289. Rashid, W., Asim, S., Rashid, S., Rafique, S., Aziz, R. S., Iftikhar, S., ... & Arfat, Y. (2023). Antioxidant and anti-mutagenic potential of mint (*Mentha* arvensis) and its chemical characterization by HPLC. *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences*, *17*(04), 514-514.

290. Ćavar Zeljković, S., Šišková, J., Komzáková, K., De Diego, N., Kaffková, K., & Tarkowski, P. (2021). Phenolic compounds and biological activity of selected *Mentha* species. *Plants*, *10*(3), 550.

291. Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., & Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *6*(9), 760-766.

292. Nickavar, B., Alinaghi, A., & Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(3), 203-209.

293. Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *30*(4), 652-664.

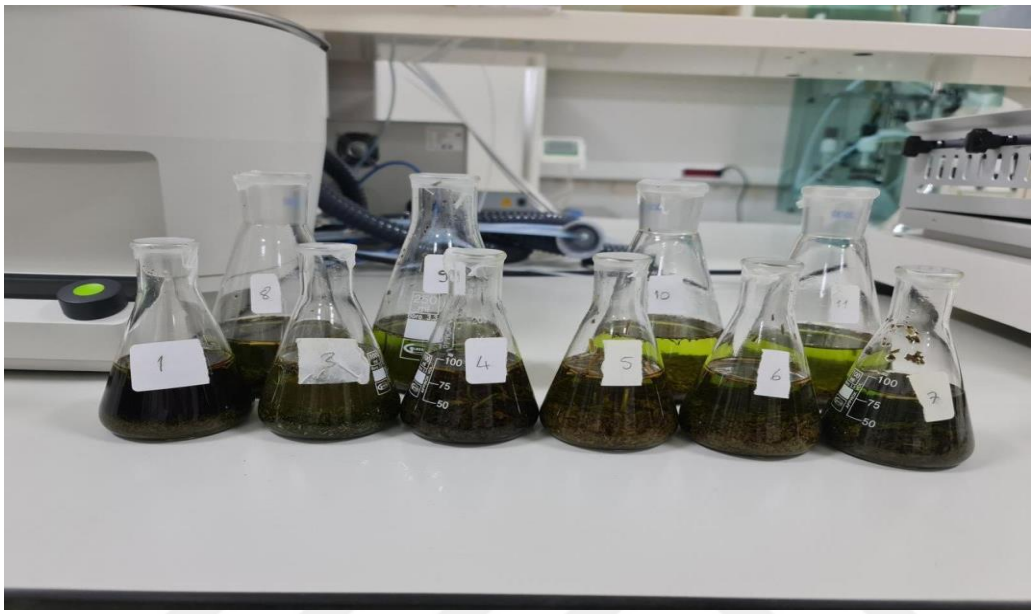
294. Yang, J., Lee, H., Sung, J., Kim, Y., Jeong, H. S., & Lee, J. (2019). Conversion of rutin to quercetin by acid treatment in relation to biological activities. *Preventive Nutrition and Food Science*, *24*(3), 313.

295. Kim, T. J., Silva, J. L. & Jung, Y. S. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. *Food Chem* 126, 116–120 (2011).

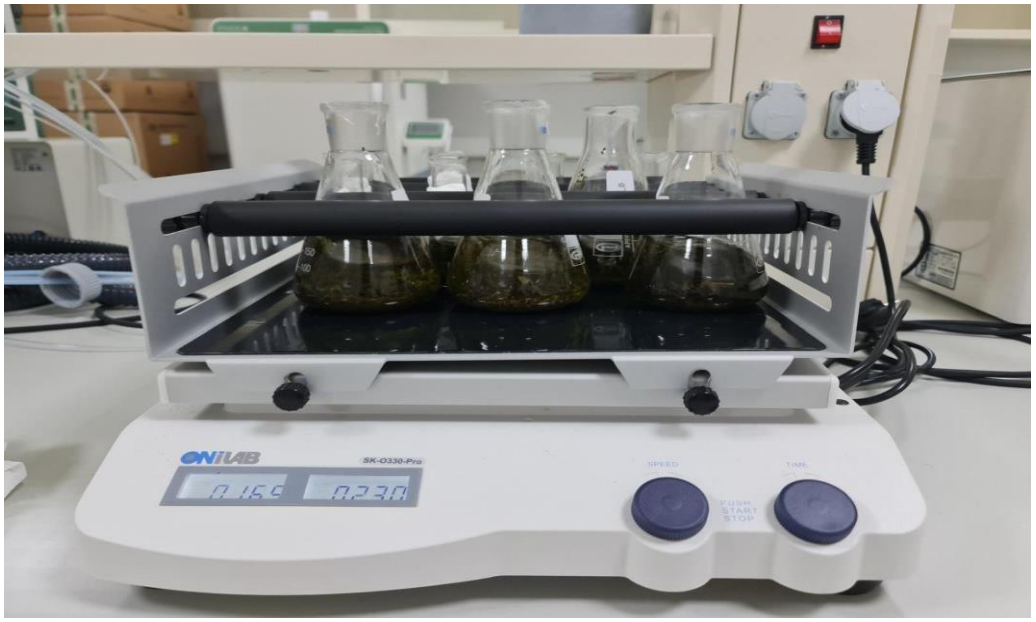
EKLER

EK-1. Deneyle İlgili Fotoğraflar

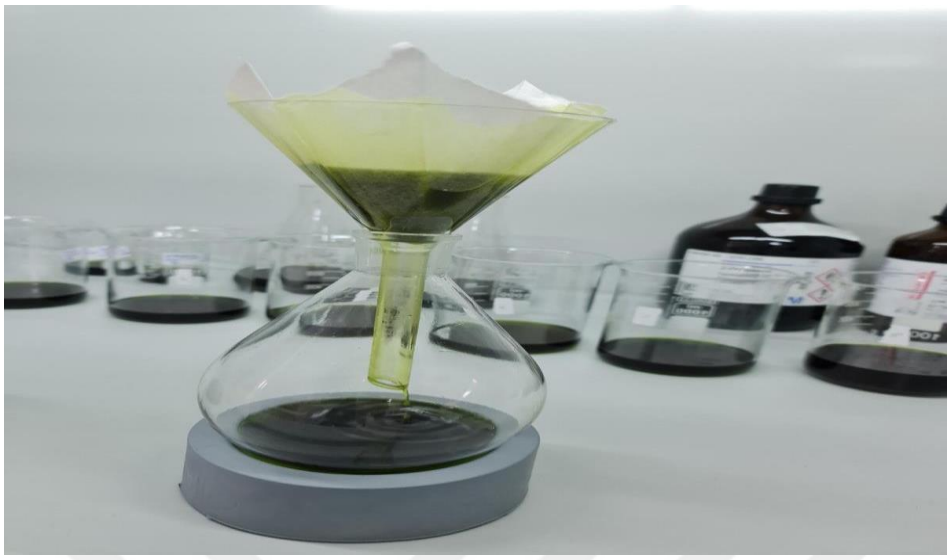
Bitki ekstraksiyonları hazırlık aşamaları 1



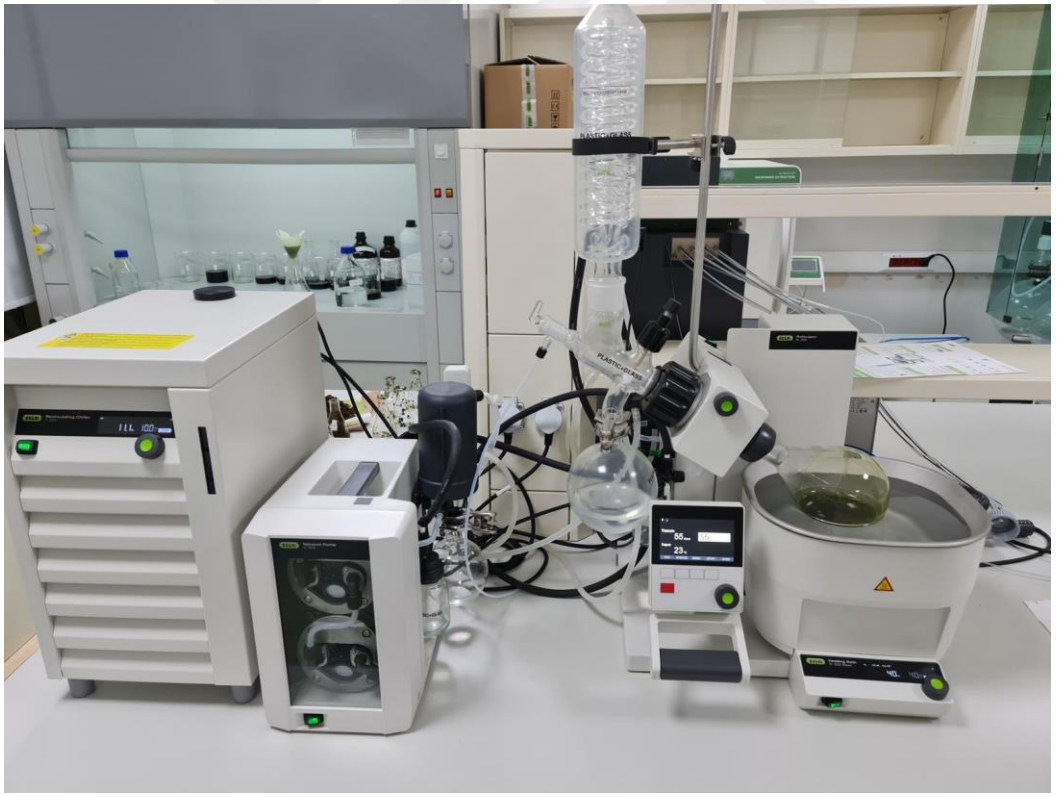
***Mentha* ekstraksiyonları orbital çalkalayıcıda**



***Mentha* ekstrelerinin filtre edilmesi**



***Mentha* ekstreleri rotary evoporatorda**



Ekstreler ultra derin dondurucuda



Ekstreler liyofilizatörde



Antioksidan aktivite tayin yöntemleri öncesi ekstrelerin hazırlanması

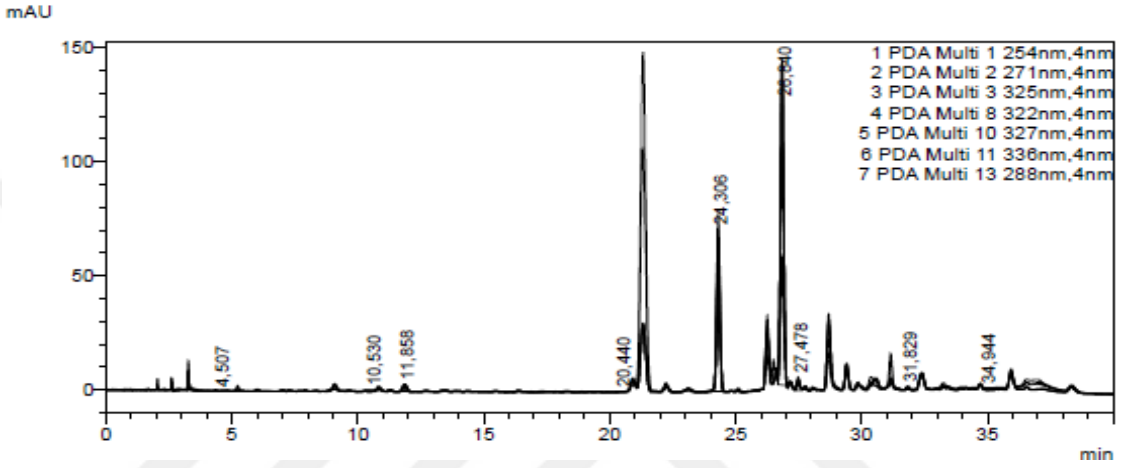


EK-2. *Mentha* (A1) HPLC Sonuçları

<Sample Information>

Sample Name	: A1		
Sample ID	:		
Data Filename	: A1.lcd		
Method Filename	: 15 fenolik madde çalışması 36-kalibrasyon ok.lcm		
Batch Filename	: A and B.lcb		
Vial #	: 3-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 25.05.2023 14:19:40	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 30.05.2023 13:34:07	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

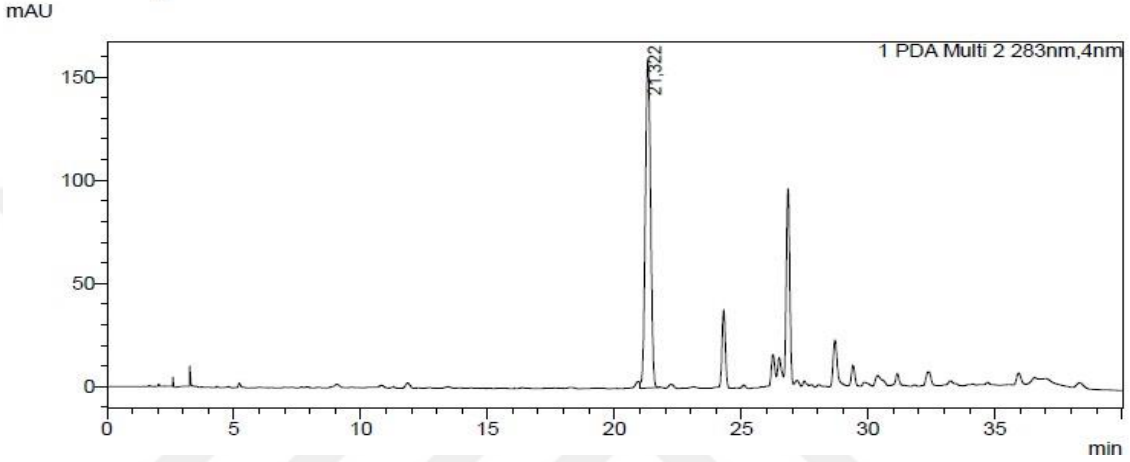


EK-3. *Mentha* (A1) HPLC (eriositrin) Sonucu

<Sample Information>

Sample Name	: A1		
Sample ID	:		
Data Filename	: A1.lcd		
Method Filename	: Eriocitrin metodu-ok.lcm		
Batch Filename	: A and B.lcb		
Vial #	: 3-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 25.05.2023 14:19:40	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 30.05.2023 13:34:07	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

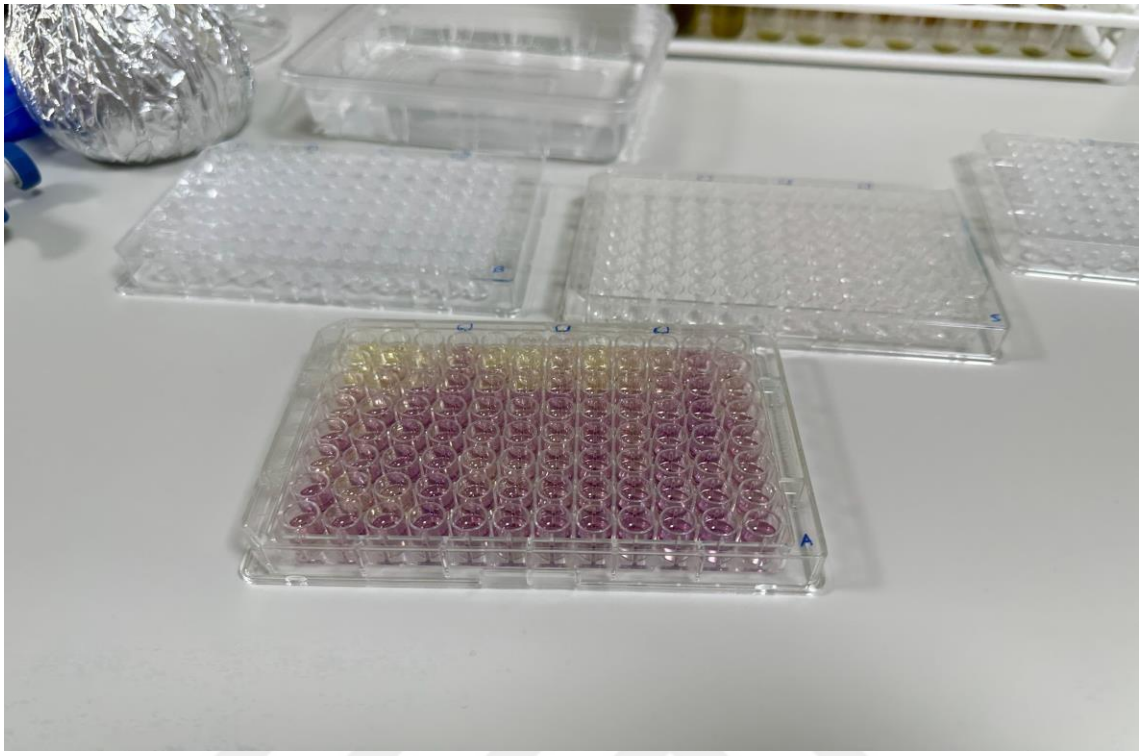


EK-4. Pearson R Analiz Sonucu

DPPH –Mentha A Grubu Ekstreleri Fenolik Bileşikleri Korelasyon Tablosu

DPPH A	IC50 A vs. Eriocitrin	IC50 A vs. Naringenin	IC50 A vs. Quercetin	IC50 A vs. Apigenin-7-glucoside	IC50 A vs. Rosmarinic Acid	IC50 A vs. Rutin	IC50 A vs. Ferulic Acid	IC50 A vs. p-Coumaric Acid	IC50 A vs. Caffeic Acid	IC50 A vs. Chlorogenic Acid	IC50 A vs. Gallic Acid
Pearson r											
r	-0,6088	0,9542	-0,484	-0,4948	-0,3397	-0,7583	-0,1394	0,0584	0,9569	0,07714	-0,1186
95% confidence interval	-0,8853 to -0,01407	0,8286 to 0,9883	-0,8400 to 0,1633	-0,8441 to 0,1494	-0,7805 to 0,3267	-0,9335 to -0,2907	-0,6822 to 0,5025	-0,5611 to 0,6360	0,8382 to 0,9891	-0,5481 to 0,6471	-0,6708 to 0,5181
R squared	0,3706	0,9105	0,2343	0,2448	0,1154	0,5751	0,01942	0,003411	0,9157	0,005951	0,01407
P value											
P (two-tailed)	0,0468	<0,0001	0,1314	0,1218	0,3067	0,0068	0,6828	0,8646	<0,0001	0,8216	0,7283
P value summary	*	****	ns	ns	ns	**	ns	ns	****	ns	ns
Significant? (alpha = 0.05)	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No
Number of XY Pairs	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11

EK-5. DPPH• deneyi mikroplateler



EK-6. ABTS•+ deneyi mikroplateler

