

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AVOKADO YAPRAĞI FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN OHMİK ISITMA  
DESTEKLİ EKSTRAKSİYON PARAMETRELERİNİN OPTİMİZE  
EDİLMESİ VE EKSTRAKTLARIN ENKAPSÜLASYONU**

**Lale GÜMÜŞTEPE**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Ebru AYDIN**

**II. Danışman  
Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2022**



© 2022 [Lale GÜMÜŞTEPE]

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Avokado .....	3
2.2. Ekstraksiyon, Biyoaktif Bileşenler, Antioksidan Aktiviteler .....	7
2.3. Enkapsülasyon ve Özellikleri .....	15
3. MATERYAL VE METOT .....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Metotlar .....	22
3.2.1. Su Aktivitesi .....	22
3.2.2. Ohmik Isıtma Destekli Ekstraksiyon İşlem Koşullarının Optimizasyonu .....	23
3.2.3. Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi .....	26
3.2.4. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	26
3.2.5. DPPH Serbest Radikalleri Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi....	27
3.2.6. Fenolik Bileşiminin HPLC ile Belirlenmesi .....	28
3.2.7. Avokado Yaprağı Ekstraktının $\alpha$ -Siklodekstrin ile Enkapsüle Edilmesi .....	29
3.2.8. Enkapsüle Örneklerin Nem ve Su Aktivitesi Analizleri .....	32
3.2.9. Enkapsüle Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	32
3.2.10. Enkapsülasyon Etkinliği (% EE).....	32
3.3. İstatistiksel Analizler .....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Taze ve Kuru Avokado Yapraklarının Bazı Fizikokimyasal Özellikleri.....	35
4.2. Yaprak Ekstraktlarının Verim, Toplam Fenolik Madde ve DPPH Miktarlarının Ekstraksiyon Modellemesi.....	36
4.3. Avokado Yaprak Ekstraktlarının Verim, Toplam Fenolik Madde ve DPPH Miktarlarının Optimizasyonu ve Modelin Doğrulanması.....	43
4.4. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Avokado Yaprağı Su Ekstraktının Enkapsülasyonu, Bazı Fizikokimyasal Özellikleri.....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR .....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	61

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

# AVOKADO YAPRAĞI FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN OHMİK ISITMA DESTEKLİ EKSTRAKSİYON PARAMETRELERİNİN OPTİMİZE EDİLMESİ VE EKSTRAKTLARIN ENKAPSÜLASYONU

Lale GÜMÜŞTEPE

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ebru AYDIN

II. Danışman: Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN

Ticari değeri yüksek egzotik meyvelerden biri olan avokado (*Persea americana* Mill.), gün geçtikçe popüleritesini artırmaktadır. Son zamanlarda ağaç budama atıklarına olan ilginin artması ile birlikte ticari değeri olmayan, geleneksel olarak bitki çayı olarak tüketilen yapraklar fonksiyonel doğal gıdaların zenginleştirilmesine katkı sağlamış oldu. Avokado ağacının yapraklarının içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerden klorojenik asit, kateşin ve rutin sağlık üzerine birçok olumlu etkileri (antidiyabetik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal) bulunmaktadır.

Bu çalışmada, yanıt yüzey metodu (RSM) ve merkezi karma deney tasarımı (CCD) kullanılarak avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon yöntemiyle biyoaktif bileşenlerinden fenolik maddelerin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Avokado yapraklarının maksimum ekstraksiyon verimi (%), toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/100g kuru madde) ve serbest radikalleri yakalama aktivitesi (mg TE/100g kuru madde) optimize edildiğinde sırasıyla voltaj ve süre için 9.38 V/cm ve 6 dakika olarak bulunmuştur.

RSM tasarımında belirlenen optimum parametreler kullanılarak ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon işleminden elde edilen ekstraktın polifenol kompozisyonu tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen optimum ekstrakt farklı oranlarda  $\alpha$ -siklodekstrin ile inklüzyon kompleksi oluşturularak enkapsüle edilmiştir. Elde edilen toz kapsüllerin nem içeriği ve enkapsülasyon etkinliği sırası ile %10.52 ve %47.13 olarak bulunmuştur. Yapılan fenolik içerik analizi sonucunda hem ekstraktın hem de toz kapsüllerin yüksek miktarda klorojenik asit içerdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak avokado yapraklarının sulu ekstaktın gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinden biri olan ohmik ısıtma sistemi ile fenoliklerin kısa sürede, düşük enerji ihtiyacı ile elde edilebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca ekstrakt ve toz kapsüllerin antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Antioksidan

özellikleri tespit edilen avokado yapraklarının enkapsüle edilmesiyle elde edilen toz kapsüllerin çevre dostu ve biyolojik değeri yüksek olan yeni fonksiyonel gıda ürünü ya da gıda takviyesi olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Avokado (*Persea americana* Mill.), yanıt yüzey yöntemi (RSM), enkapsülasyon, ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon.

**2022, 61 sayfa**



## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **OPTIMIZATION OF EXTRACTION PARAMETERS AND ENCAPSULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM AVOCADO LEAF BY OHMIC HEATING ASSISTED EXTRACTION**

**Lale GÜMÜŞTEPE**

**Süleyman Demirel University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ebru AYDIN**

**Co-Supervisor: Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN**

Avocado (*Persea americana* Mill.) is an exotic fruit with high commercial value and, due to its nutrient composition and bioactive compounds its popularity is increasing worldwide. In addition, with the increase of planted avocado tree, its wastes (leaves, peel, seed) may cause air, soil, and water pollution. However, these wastes may be managed as important resources (herbal tea, plant food supplement etc.) due to their rich bioactive compounds. Among avocado tree wastes, leaves have the highest phenolic compounds such as chlorogenic acid, catechin, and rutin that may promote health activities (e.g. antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial).

In this study, it was aimed to optimize phenolic compounds from bioactive constituents from avocado leaves by ohmic heating assisted water extraction using the response surface method (RSM) and central mixed experiment design (CCD). The maximum extraction yield (%), total phenolic content (mg GAE/100g dry matter), and free radical scavenging activity (mg TE/100g dry matter) of avocado leaves were determined as 9.38 V/cm and 6 min for voltage gradient and time, respectively.

The phenolic rich extract's encapsulated form using an inclusion complex with  $\alpha$ -cyclodextrin at different rates was produced. The moisture content and encapsulation efficiency of the powder capsules were found at 10.52 % and 47.13 %, respectively. Results of phenolic content analysis indicated that both extract and powder capsules contained high amounts of chlorogenic acid.

Consequently, it was found that avocado leaves phenolics of avocado leaves could be extracted in short time with low energy requirement using ohmic assisted heating system which is a green technology extraction technique. Additionally, extract and powder capsules exhibited antioxidant activity. These results showed that both extract and powder capsules may be use for the production of new functional food products or plant-based dietary supplements.

**Keywords:** Avocado (*Persea americana* Mill.), response surface method (RSM), encapsulation, ohmic heating assisted water extraction.

**2022, 61 pages**



## TEŞEKKÜR

Her şeyden önce bana her daim yardım eden ve beni yönlendiren, onunla çalışmaktan keyif aldığım, bilgi ve tecrübesi ile bilimsel ve akademik alanda kendimi geliştirmem için desteğini esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Ebru AYDIN'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans tez çalışmamda eş danışmanlığımı yaparak beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan laboratuvar çalışmamda ve tez yazım aşamasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer Eş Danışman Hocam Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı içtenlikle sunuyorum.

Yüksek lisans hayatımın başlangıcından bitimine kadar her konuda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Yüksek Gıda Mühendisi Pınar ÜNSAL, Yüksek Gıda Mühendisi Muhammed Mustafa ÖZÇELİK, Arş. Gör. Ayşe BIYIKLI, Yüksek Gıda Mühendisi Sedef AYDIN, Yüksek Gıda Mühendisi Merve Seçil TURAN, Yüksek Gıda Mühendisi Mehmet AKSU, Yüksek Gıda Mühendisi Oğuzhan GEDİK'e ve Arş. Gör. Melis YILDIZ'a teşekkürlerimi sunuyorum. Tezimin kapsül aşamasında yardımlarını esirgemeyen Kimya Mühendisliği Bölümü'nden Doç. Dr. Mustafa KARABOYACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımda her zaman desteklerini hissettiğim, eğitim hayatım boyunca ve tez çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olup maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok değerli ailem Ersin Murad GÜMÜŞTEPE, Aynur GÜMÜŞTEPE ve Beyza GÜMÜŞTEPE'ye sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Lale GÜMÜŞTEPE  
ISPARTA, 2022

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. 'Fuerte' çeşidi avokado ağacı ve yaprakları .....	3
Şekil 2.2. Ohmik ısıtma sistemi.....	8
Şekil 3.1. Avokado ( <i>Persea americana</i> Mill.) çeşidi ağacı yaprakları.....	19
Şekil 3.2. Yaş ve kuru avokado yaprağının nem tayin cihazında nem oranının hesaplanması .....	20
Şekil 3.3. Ayıklama, temizleme ve kurulama işlemlerinden sonra kurutma için tepsilere üst üste gelmeyecek şekilde konulmuş ve kurutulmuş avokado yaprakları.....	20
Şekil 3.4. Kurutma işlemi sonrasında elde edilen kuru yapraklar ve laboratuvar tipi bir parçalayıcı kullanılarak öğütülmesi ve elekten geçirilmesi .....	21
Şekil 3.5. Taze ve kurutulmuş avokado yaprağı örneklerinin su aktivitesi cihazı ile $a_w$ değerlerinin belirlenmesi .....	22
Şekil 3.6. Ohmik ısıtma cihazı .....	23
Şekil 3.7. Sabit ağırlığa gelmiş avokado yaprak ekstraktlarının bulunduğu cam petriler .....	26
Şekil 3.8. Ekstraksiyon koşullarında elde edilen örneklerde toplam fenolik madde tayini .....	27
Şekil 3.9. $\alpha$ -Siklodekstrin ile optimum ekstraktın homojenizasyon işlemi.....	30
Şekil 3.10. $\alpha$ -Siklodekstrin ile optimum ekstraktın enkapsülasyon işlemi ....	31
Şekil 3.11. Kurutulan kapsüllerin toz hale getirilme işlemi .....	31
Şekil 3.12. Ultrason destekli ekstraksiyon işlemi.....	33
Şekil 4.1. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstrakt verimi değerinde, ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden voltaj ve sürenin etkisine bağlı değişimi.....	38
Şekil 4.2. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraktının toplam fenolik madde (TFM) miktarının ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden voltaj ve sürenin etkisine bağlı değişimi .....	41
Şekil 4.3. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraktının DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerinin ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden voltaj ve sürenin etkisine bağlı değişimi.....	43
Şekil 4.4. Avokado yaprağı fenolik ekstraktından üretilen toz kapsüller .....	45
Şekil 4.5. $\alpha$ -Siklodekstrin-fenolik ekstraktından üretilen kapsüllere ait SEM görüntüleri; a) $\alpha$ -SD1 b) $\alpha$ -SD2 c) $\alpha$ -SD3 d) $\alpha$ -SD4.....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Avokado üreten bazı ülkeler ve 2020 yılındaki avokado üretim miktarları.....	4
Çizelge 2.2. Avokado ( <i>P. americana</i> Mill.) yaprağının biyolojik özellikleri ile kardiyovasküler hastalıkları, diyabet, kanser ve enfeksiyon tedavi edici uygulamaları.....	6
Çizelge 2.3. Avokado ( <i>P. americana</i> Mill.) yaprağında bulunan bazı biyoaktif bileşikler .....	7
Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri ...	24
Çizelge 3.2. Merkezi karma deneysel tasarımı .....	25
Çizelge 3.3. Avokado ağacı ( <i>Persea americana</i> Mill.) yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonunun $\alpha$ -siklodekstrin ile oluşturulan enkapsülasyon deneme deseni.....	30
Çizelge 4.1. Yaş ve kurutulmuş avokado yapraklarının bazı fizikokimyasal özellikleri .....	35
Çizelge 4.2. Avokado yaprağı ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstrakt verimi (%), TFM (mg GAE/100g km) ve DPPH (mg TE/100g km) değerlerinde meydana gelen değişimler .....	36
Çizelge 4.3. Avokado yaprağı ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstrakt verimi (%), TFM (mg GAE/100g km) ve DPPH (mg TE/100g km) değerlerinde meydana gelen değişimlere ait model katsayılar değerlendirme parametreleri.....	37
Çizelge 4.4. Avokado yaprağı optimum ekstraktından enkapsülasyon işlemi deneme deseni sonuçları.....	45
Çizelge 4.5. Ekstrakt ve kapsüllerin fenolik bileşenleri (mg/100g km) .....	46
Çizelge 4.6. Ekstrakt ve kapsüllerin fonksiyonel özellikleri .....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Amper
$a_w$	Su aktivitesi
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
CCD	Merkezi karma tasarım
cm	Santimetre
DAD	Diode array dedektör
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
FAOSTAT	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g	Gram
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC <sub>50</sub>	%50 inhibisyon konsantrasyonu
kHz	Kilohertz
kg	Kilogram
L	Litre
LC/MS-MS	Sıvı kromatografi kütle kütle spektrometresi
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mm-Hg	Milimetre civa
mM	Milimolar
MS	Kütle spektrometresi
nm	Nanometre
Q-TOF-MS	Uçuş süreli kütle spektrometresi
rpm	Devir/dakika
RSM	Yanıt Yüzey Metodu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SD	Siklodekstrin
TE	Trolox eşdeğeri
TEAK	Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPLC	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
V	Volt
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
%EE	Yüzde enkapsülasyon etkinliği
°C	Santigrat derece

## 1. GİRİŞ

Avokado veya “timsah armut” olarak bilinen *Persea americana*, Orta Amerika'da ortaya çıkan ancak şu anda çoğu tropikal ve subtropikal ülkelerde bulunan yaklaşık 20 m yüksekliğinde bir ağaçtır (Adeyemi vd., 2002). Avokado meyvesinin yaprakları, çeşitli hastalıkların tedavisinde ve yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesinde biyoaktif antioksidan maddeler olarak potansiyel uygulamaları olan, yüksek antioksidan aktiviteye sahip katma değerli bileşiklerin geri kazanımı için önemli bir kaynak teşkil ettiğini göstermiştir (Castro-López vd., 2019).

Avokado (*Persea americana*), içerdiği besin öğeleri ve fitokimyasallarının kompozisyonu ile sağlık üzerine yararlı etkileri dolayısıyla günümüzde süper gıda olarak bilinen en önemli bitkisel kaynaklı gıdalardan biridir. Avokado meyvesi ve yan ürünleri, sağlığımız açısından çok değerli biyoaktif bileşenleri bünyesinde barındırmaktadır. Dolayısıyla gıda, tıp, eczacılık ve kozmetik sanayi gibi birçok alanda kullanımı mevcuttur (Gümüştepe vd., 2022). Avokadonun zengin biyoaktif içeriğinin kardiyovasküler hastalıklar (Brovelli vd., 2005; Owolabi vd., 2005; Ojewole vd., 2007; Brai vd., 2007; Lima vd., 2012; Brai vd., 2014; Oboh vd., 2016; Polat Köse vd., 2020), diyabet (Brai vd., 2007; Isaac vd., 2014; Oboh vd., 2014; Makopa vd., 2020), kanser (Butt vd., 2006; Roberts vd., 2007; Ant vd., 2017), enfeksiyon (De Almeida vd., 1998; Adeyemi vd., 2002; Kumar vd., 2017; Makopa vd., 2020) vb. hastalıklara etkisi literatürde ilgi çeken bir konu haline gelmiştir.

Tüketici tercihini en fazla olduğu avokadolar ise kışlık olarak yetiştirilen Fuerte çeşididir ve bu çeşitlerin üretiminin %75-80'nin Antalya bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Ağaç sayısının her geçen yıl artmasına bağlı olarak avokado ağacının yaprakları “SIFIR ATIK” yaklaşımı kapsamında çevreye bırakılan atıkların katma değeri daha yüksek bir ürün olarak değerlendirilerek kullanımına yönelik katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Böylece Türkiye’de Akdeniz bölgesinde en fazla üretilen Fuerte avokado çeşidinin hasat sonrası budama dönemindeki yaprak atığı, antioksidan maddelerce zenginleştirilmiş

fonksiyonel bir ürüne dönüştürülebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada Fuerte çeşidi avokado yapraklarının kullanılmasının nedeni yapılan literatür çalışmalarında bu yaprak çeşidiyle çok az çalışma olması ve Türkiye ile Dünya genelinde hem çok fazla üretilen hem de en fazla tüketilen avokado çeşidi olmasıdır. Hem çeşidi hem de üretildiği coğrafi konumu belirli olan Fuerte avokado yapraklarının biyoaktif bileşen içeriği tespit edildikten sonra  $\alpha$ -Siklodekstrin ile enkapsüle edilerek literatüre katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

Türkiye’de en fazla üretilen avokado Hass, Fuerte ve Bacon çeşitleridir (Bayram, 2010). Bu proje kapsamında Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen çeşitlerden Fuerte avokado yaprak atıkları kullanılarak ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyonu optimizasyonu yapılmıştır. Optimum şartlarda elde edilecek olan ekstraktların ise toplam fenolik madde içeriği, serbest radikalleri yakalama ve ekstraksiyon verimi ile birlikte fenolik kompozisyon analizleri yapılmıştır. Bu çalışmanın son aşamasında optimum ekstraktlar inklüzyon kompleksi ile enkapsüle edilip nem içeriği, su aktivitesi ( $a_w$ ) ve % enkapsülasyon etkinliği ile serbest radikalleri yakalama aktivitesi, fenolik kompozisyonu ve morfolojik analizi (SEM) gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Avokado

Avokado, *Plantae* krallığına, *Lauraceae* ailesine, *Laurales* takımına, *Persea* cinsine aittir. Aslen Orta Amerika'dan gelen avokado ağacı *Persea* ve *Oreodaphne* olmak üzere iki alt türden oluşur. Botanik olarak '*Persea americana*' olarak isimlendirilen avokadonun yaygın olarak tüketilen üç türü bulunmaktadır: Bunlar *P. americana* var. *Drymifolia* (Meksika ekotipi), *P. americana* var. *Guatemalensis* (Guatemala ekotipi) ve *P. americana* var. *Americana* (Batı Hindistan ekotipi)'dır (Koller, 1992). Mevcut ticari çeşitler belirtilen üç türün melezlenmesiyle üretilir. 'Fuerte' çeşidi avokado meyvesi Meksika x Guatemala türlerinin melezi olup, ağaçları büyük ve geniş bir alana yayılarak gelişme göstermektedir. 1911 yılında Meksika'da bulunmuştur ve 1913 yılında Kaliforniya'daki aşırı soğuklara dayandığı için kuvvetli anlamına gelen 'Fuerte' ismi verilmiştir. Yaprakları ezildiğinde anason kokusu açığa çıkmaktadır (Şekil 2.1). Hasat zamanı Kasım ayının ilk haftasında başlamakta ve Nisan ayının son haftasında bitmektedir (Demirkol, 2002; Bayram, 2006). Ticaretteki diğer yaygın çeşitler arasında Bacon, Fuerte, Hass, Gwen, Lamb, Pinkerton, Reed ve Zutano olup her birinin farklı şekilleri, dokuları, renkleri ve kokuları bulunur (Dabas vd., 2013). Ayrıca en iyi bilinen ve pazarlanan türlerin Hass ve Fuerte çeşitleridir (Litz vd., 2007).



Şekil 2.1. 'Fuerte' çeşidi avokado ağacı ve yaprakları

Anavatanı Orta Amerika (Meksika, Guatemala, El Salvador ve Honduras) olmasına rağmen zengin besin içeriğinden dolayı avokado meyvesi günümüzde tropikal ve subtropikal bölgelerde de ticari olarak üretilmektedir (Litz vd., 2007). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAOSTAT) tarafından 2020 yılında yayınlanan rapora göre Dünya üzerinde avokado yetiştiren ülkelerin üretim miktarları rapor edilmiş olup en fazla üretim yapan ülke Meksika olmuştur (Çizelge 2.1). Ayrıca küresel avokado üretiminin 2018 yılında 6 milyon tonun üzerine çıktığı ve 547849 hektar büyüklüğünde alanda avokado üretildiği bildirilmiştir (FAO, 2020).

Çizelge 2.1. Avokado üreten bazı ülkeler ve 2020 yılındaki avokado üretim miktarları.

Üretici Ülkeler	Üretim Miktarı (ton)
Brezilya	242932
Kolombiya	535021
Dominik Cumhuriyeti	661626
Endonezya	461613
Meksika	2300889
Peru	535911
Türkiye	4209
Amerika Birleşik Devletleri	217091

Avokado iklim koşulları sebebiyle her bölgede yetiştirilmez ve çoğu ülke avokado ihtiyacını başka ülkelere karşılamaktadır. Türkiye'nin ise iklimi avokado üretimine uygundur ve pazarda satış fiyatı yüksektir bu sebeple, ülkemizde avokado yetiştiriciliği günden güne artmaktadır (Güzel, 2018). Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2019 yılında yayınladığı rapora göre avokado üretiminin 2017 yılında 2.765 ton iken, 2018 yılında 3.164 tona çıktığı belirtilmiştir. 2018 yılında avokado üretiminin illere göre dağılımının ise Antalya'da 2.567 ton, Mersin'de 496 ton, Muğla'da 79 ton ve Hatay'da 22 ton olduğu rapor edilmiştir (TÜİK, 2019).

Avokadoda en yaygın bulunan biyoaktif bileşenler ise polifenoller, karotenoitler, tokoferoller ve sterollerdir. Polifenoller meyve eti, kabuk, tohum ve yapraklarda dağılırken, karotenoitler ve tokoferoller çoğunlukla avokado meyvesinin etinde bulunmaktadır (Jimenez vd., 2020). Avokadodaki DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesinin sırası ile yaprak > kabuk > yağ > meyve eti olduğu bildirilmiştir (Kumar ve Cumbal, 2016). Dolayısıyla avokado ağacı yapraklarındaki biyoaktif bileşenlerin avokadonun diğer kısımlarına göre daha yüksek antioksidan aktiviteye dolayısıyla daha fazla biyoaktif bileşene yüksek miktarlarda sahip olduğu görülen bir gerçektir. Bunun yanında literatür araştırmalarında kullanılan avokadoların çoğunlukla marketlerden alındığı görülmüştür. Ancak fenolik ekstraksiyonunda kompozisyonun ve fenoliklere bağlı fonksiyonel özelliklerin belirlendiği çalışmalarda fenolik miktarını ve buna bağlı özelliklerini bitkilerin türünün, çeşidinin, toplanma bölgesi ve zamanı gibi bazı özelliklerin etkilediği bilinen bir gerçektir.

Avokado yapraklarında bulunan biyoaktif bileşenlerin serbest radikalleri yakalama aktivitesi yüksek reaktif radikallere bir hidrojen atomunu bağışlamaları sonucunda serbest radikal oluşumunu ve oksidatif stresi önlemesine dayanmakta olup (Kesavan vd., 2018) bu özellikleri sayesinde antioksidan, anti-inflamatuar, antifungal ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği, kardiyovasküler hastalıkları (Vauzour vd., 2010) ve kanser risklerini azalttığı bildirilmiştir (Basli vd., 2017). Ayrıca karbonhidratların monosakkaritlerine kadar parçalanmasını sağlayan; tükürükte bulunan  $\alpha$ -amilaz ve ince bağırsakta bulunan  $\alpha$ -glukozidaz sindirim enzimleri aktivitelerinin durması/yavaşlaması sonucunda kana geçen monosakkarit miktarı azaltıp diyabet hastalığının tedavisinde kullanılabileceği de bildirilmiştir (Villa vd., 2017). Avokado yapraklarının anti-diyare, anti-ülser, anti-depresan gibi etkileri olduğu yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla bildirilmiştir (Odo vd., 2014; Oluwole vd., 2011; Holst ve Williamson, 2008; Ortega-Arellano vd., 2019). Avokado yapraklarının kardiyovasküler hastalıkları, diyabet, kanser ve enfeksiyon tedavi edici uygulamaları Çizelge 2.2'de detaylı olarak sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Avokado (*P. americana* Mill.) yaprağının biyolojik özellikleri ile kardiyovasküler hastalıkları, diyabet, kanser ve enfeksiyon tedavi edici uygulamaları

Hastalıklar	Etki	Kaynak
Kardiyovasküler Hastalıklar	Antikolinergik etki	Polat Köse vd., 2020
	Aort kanallarında vazorelaksasyon etki	Owolabi vd., 2005
	Antihiperglisemik etki	Lima vd., 2012
	Hipotansif aktivite	Brovelli vd., 2005
	Ateroskleroza karşı koruyucu etki ve hipokolesterolemik etki	Brai vd., 2007
	Hipotansiyon etki	Ojewole vd., 2007
	Doku hasarına karşı hepatoprotektif etki	Brai vd., 2014
	Antikolinesteraz etki	Oboh vd., 2016
	Antidiyabetik aktivite	Isaac vd., 2014; Oboh vd., 2014; Makopa vd., 2020
	Kanser	Hipoglisemik etki
Emrizen fare göğüs epitelyumunda G2-M hücre döngüsü tutuklama ve kaspaz-bağımlı apoptozu indükleyici aktivite ile insan göğüs kanseri hücre hattında Bim'e bağlı sitostatik ve sitotoksik etki		Butt vd., 2006
İnsan göğüs kanseri hücre hattında antikanser etki		Roberts vd., 2007
Larinks kanseri dokularında <i>in vitro</i> Adenozin Deaminaz (ADA) üzerine aktive edici etki		Ant vd., 2017
Enfeksiyon	<i>K. pneumonia</i> ve <i>S. epidermidis</i> 'e karşı antibakteriyel aktivite ve <i>C. albicans</i> and <i>C. tropicalis</i> 'e karşı antifungal aktivite	Makopa vd., 2020
	Albino Wistar sıçanlarında X-ışını radyasyonuna karşı antiinflamatuvar aktivite, anti-klastrojenik etki ve antijenotoksik etki	Kumar vd., 2017
	<i>In vivo</i> analjezik etki ve antiinflamatuvar aktivite	Adeyemi vd., 2002
	<i>In vitro</i> herpes simpleks virüsü tip 1, Aujeszky hastalığı virüsü ve adenovirüs tip 3 üzerine antiviral aktivite	De Almeida vd., 1998

Avokado yapraklarından izole edilen biyoaktif bileşiklerin sahip oldukları antioksidan aktiviteleri meyvenin farklı kısımlarından elde edilen biyoaktif bileşiklerle karşılaştırıldığında, en yüksek antioksidan aktivitenin avokado yapraklarında bulunduğu bildirilmiştir (Obob vd., 2014; Kumar ve Cumbal, 2016; Murathan ve Kaya, 2020). Avokado yapraklarında bulunan biyoaktif bileşenlerin fenolik bileşikler ve karotenoitlerden oluştuğu yapılan literatür çalışmalarında bildirilmiştir (Gümüštepe vd., 2022). Tezde materyal olarak kullanılan avokado yapraklarının içeriğinde tanımlanan ana biyoaktif bileşenleri Çizelge 2.3'te detaylı olarak sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Avokado (*P. americana* Mill.) yaprağında bulunan bazı biyoaktif bileşikler

Biyoaktif Bileşikler	İçerik	Kaynak
Fenolik bileşikler	Apigenin, Epikateşin, Epigallokateşin, İzorhamnetin, Luteolin, Luteolin 7-O- glukozit, Luteolin-5-glukozit, Kuersetin, Kuersetin 3-O-arapiranosid, Kuersetin 3-O- $\beta$ -glukopiranozit, Kuersetin 3-O- $\beta$ -D glukozit, Kuersetin-O-heksosit, Rutin, Kafeik asit, Ferulik asit, Gallik asit, Hidroksibenzoik asit	Owolabi vd., 2010; Lima vd., 2012; Isaac vd., 2014; Obob vd., 2014; Kumar ve Cumbal, 2016; Castro-Lopez vd., 2019; Polat Köse vd., 2020
Karotenoitler	$\alpha$ -karoten, $\beta$ -karoten, $\gamma$ -karoten, Kriptoksantin, Lutein, cis-Lutein, Isolutein, Violaksantin, Zeaksantin, Anteroksantin, Neoksantin	Gross vd., 1973; Monge-Rojas ve Campos, 2011; Kopec vd., 2014

## 2.2. Ekstraksiyon, Biyoaktif Bileşenler ve Antioksidan Aktivite

Bitki materyallerinden fenolik madde ekstraksiyonunda doğru çözücü ile doğru ekstraksiyon parametreleri ve yönteminin seçimi ekstraksiyon işleminin en önemli adımlarından biri olup, günümüzde geleneksel yöntemler dışında yeşil

teknolojiler olarak bilinen yeni ekstraksiyon tekniklerinden de (mikrodalga, ultrases, yüksek basınç, süperkritik akışkan, ohmik vb.) yararlanılmaktadır. Bu yeni tekniklerin tercih edilmesinin en önemli sebepleri çevre dostu (az miktarda solvent kullanımı, enerji tasarrufu ve kısa ekstraksiyon süresi) olmalarının yanında ekstrakte edilen bileşenin veriminin artmasıdır.



Şekil 2.2. Ohmik ısıtma sistemi

Son yıllarda yoğun olarak bir çok alanda kullanılan ohmik ısıtma teknolojisi ise yenilenebilir enerjiler (örneğin güneş ve rüzgar enerjisi) kullanılarak üretilen elektrikle çalışan ve daha düşük karbon emisyonu sağlayan bir diğer yeşil teknoloji yöntemidir (Rodrigues vd., 2019). Geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında ise ohmik destekli ekstraksiyon yönteminde yüksek yüzey sıcaklıklarının olmaması ve ısı aktarım katsayılarının sınırlandırılabilmesi, gıdanın renginin ve besin değerinin korunması, kısa işlem süresi ve yüksek verim gibi avantajları mevcuttur (Cullen vd. 2011).

Ohmik destekli ekstraksiyon düzeneklerinde ohmik sistem ısı kaynağı olarak işlev görmesinin yanı sıra, uyguladığı elektrik alan sayesinde hücresel dokularda elektroporasyona neden olarak biyoaktif bileşenlerin daha iyi ekstrakte edilmesine imkan tanır (Pereira vd., 2016). Yapılan çalışmalarda ohmik destekli ekstraksiyon yönteminde gıda örneği içinden kesikli veya

alternatif akım geçirilmesiyle moleküllerin sahip olduğu enerji artılarak gıda maddesinin sıcaklığının yükselmesi sağlanmaktadır (Fraye vd., 1993; Rodrigues vd., 2019). Böylece gıdanın en soğuk noktası bile en kısa sürede ısıtılacağından, özellikle sıcaklığa hasas olan biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda ohmik destekli ekstraksiyon yönteminin kullanım avantajları bulunmaktadır (Rodrigues vd., 2019). Ohmik ısıtmayı etkileyen başlıca faktörler arasında; enerji verimliliği, konsantrasyon, partikül boyutu, elektriksel alan kuvveti ve elektriksel direnç bulunmaktadır (İncedayı vd., 2019). Ayrıca ohmik ısıtmanın ürün verimliliği ve kalitesi açısından ekstraksiyon sürecini iyileştirmek için kullanıldığı pek çok çalışma da mevcuttur; kırmızı üzüm posasından polifenollerin, siyah pirinç kepeğinden antosiyaninlerin, renkli patatesten fitokimyasalların ve alglerden (*Gracilaria vermiculophylla*), şeker otu (*Stevia rebaudiana*) yaprağı, asma yaprağı ve yacon (kara elma) yaprağından polifenollerin ekstraksiyonunda ohmik destekli ısıtmadan yararlanıldığı bildirilmiştir (El Darra vd., 2013; Loypimai vd., 2015; Pereira vd., 2016; Khajehei vd., 2017; Jesus vd., 2020; Pereira vd., 2021; Moongngarm vd., 2022).

Ekstraksiyon aşamasında kullanılan yöntemler ve prosesdeki değişkenler çok çeşitli olduğundan yanıt yüzey metodu (RSM) ile proses parametrelerinin optimize edilmesi sağlanmaktadır. Yanıt yüzey metodunda ise amaç birçok değişken tarafından etkilenen tepkinin optimuma ayarlanması ve tepkiyi optimum yapan karar değişkenlerinin değerlerinin tespit edilmesidir. Yapılan literatür çalışmalarında avokado yaprak fenoliklerinin ohmik destekli ısıtma ile fenolik ekstraksiyonlarının yapıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aşağıda avokado yapraklarından bazı ekstraksiyon yöntemi, parametreleri ve farklı çözücüler kullanılarak yapılan ekstraksiyon çalışmalarına yer verilmiştir:

Owolabi vd. (2010) kurutulup (40°C) toz hale getirilen *P. americana* yapraklarının art arda petrol eteri (60-80°C) ile yağdan arındırıp, ardından sulu %70'lik etanol çözgeni ile döner buharlaştırıcıda ekstrakte edilip özü çıkarılmıştır. Ekstrakt kalıntısı, toluen, ardından %100'e kadar toluen içinde etil asetat ve etil asetat içinde MeOH ile yıkanarak silika jel kolonu (70-230 µm, 3.5x60 cm) üzerinde kromatografiye tabi tutulmuştur. %70 EtOH özütünün

silika jel kolonu kullanılarak kromatografik olarak ayrılması ve ardından hazırlayıcı ince tabaka kromatografisi (TLC) üzerinde sürekli saflaştırılması ile beş farklı flavonoid bileşik elde edilmiştir. Bileşiklerin DPPH metodu ile antioksidan aktivitesi (IC<sub>50</sub>) sırasıyla kuersetin ( $4.82 \times 10^{-5}$  mg/ml) > rutin ( $1.37 \times 10^{-4}$  mg/ml) > isorhamnetin ( $4.41 \times 10^{-4}$  mg/ml) > luteolin ( $3.34 \times 10^{-4}$  mg/ml) > apigenin > BHA bulunmuştur. Sonuçlar referans standardı BHA'dan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Lima vd. (2012) 40°C' de kurutulup toz haline getirilen *P. americana* yaprakları %50'lik etanol çözgeni kullanarak, 5 gün boyunca oda sıcaklığında ara sıra çalkalanarak maserasyon (%10 a/h) ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ham hidroalkolik özütteki alkolü tamamen uçurmak için düşük basınç altında kuruma noktasına kadar buharlaştırılıp ardından liyofilize edilmiştir. Spektrofotometrik belirleme ile apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon)  $0.730 \pm 0.005$  g'lık bir içeriği ortaya çıkarmıştır. Hidroalkolik ekstraktın LC/MS-MS ile incelenmesi sonucu glikosile edilmiş flavonoidlerin varlığını ortaya koymuştur; kuersetin-3-glukozit (izokuersitrin) ve kuersetin-3-ramnozid (kersitrin).

Arukwe vd. (2012) tarafından taze yapraklar, meyvelerin olgunlaşma başlangıcındaki yenilebilir kısımları ve çekirdekleri bir hafta süreyle havada kurutulmuştur ve öğütülerek ince toz haline getirilmiştir. *P. americana* ağacının yaprağı, meyvesi ve tohumunun fenolik bileşikleri sırasıyla  $3.41 \pm 0.64$ ,  $2.94 \pm 0.13$ ,  $6.14 \pm 1.28$  mg/100g olarak tespit edilmiştir.

Isaac vd. (2014) tarafından *P. americana* ağacının yaprakları meyvenin yenilebilir kısmı, meyve kabuğu ve çekirdeği küçük parçalara ayrılıp güneşte kurutulup toz haline getirilmiş ve sonra 37°C'de 24 saat saf su ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlardaki fenolik içerikler (mg/100g) gaz kromatografisi (GC) ile tespit edilmiş olup, avokado yaprağı ekstraktında şirincik asit (31.65), eugenol (21.52), vanilik asit (13.33), izoeugenol (12.92), gayakol (12.79), fenol (8.47), kaemferol (8.39), *p*-hidroksibenzoik asit ( $2.51 \times 10^{-4}$ ), ferulik asit ( $7.09 \times 10^{-5}$ ), apigenin ( $6.06 \times 10^{-5}$ ), naringenin ( $7.29 \times 10^{-4}$ ), epigallokateşin ( $2.31 \times 10^{-4}$ ), epikateşin ( $2.84 \times 10^{-4}$ ), lupeol ( $2.61 \times 10^{-6}$ ) tespit edilmiştir. ABTS (2,2'-azino-bis (3-

etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) serbest radikalleri yakalama kabiliyeti en yüksek tohumun sulu ekstraktında (12.997 mmol TEAK/100g), en az meyvenin yenilebilir kısmında (8.372 mmol TEAK/100g) tespit edilmiştir.

Oboh vd. (2014) tarafından *P. americana* yaprakları ve meyvenin yenilebilir kısmı, meyve kabuğu ve çekirdeği hava ile kurutulup toz haline getirilmiştir. Daha sonra örneklerin toplam fenolikleri 1M HCl ve metanol çözgeni (1:1 h/h) ile ekstrakte edilip, vakum altında süzümüştür. Süzüntü daha sonra döner bir buharlaştırıcı kullanılarak vakum altında 45°C'de buharlaştırıldıktan sonra fenolik ekstraktlar saf suda (1:100 a/h) yeniden ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlardaki fenolik içeriklerin ABTS süpürme kabiliyeti, trolox eşdeğeri antioksidan kapasite olarak sunulmuştur: Sonuçlar, tüm ekstraktların ABTS serbest radikalini temizlediğini, ancak yaprağın (31.88 mmol TEAC/100g) fenolik ekstraktının en yüksek ABTS süpürme kabiliyetine sahip olduğunu, en az ise meyvenin yenilebilir kısmının (14.79 mmol TEAC/100g) sahip olduğunu bildirilmiştir.

Kamagate vd. (2016) 3 farklı çözgen kullanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Su ekstraksiyonu için 50 g *P. americana* yaprağı tozu, 1 L saf suda 30 dakika kaynatılmıştır ve oda sıcaklığında (25°C) soğumaya bırakıldıktan sonra süzülüp, liyofilize edilmiştir. Etanol ekstraksiyonunda ise oda sıcaklığında 48 saat boyunca *P. americana* yaprağı tozu, etanol (%10, a/h) ile üç kez yumuşatılıp ara sıra çalkalanmıştır, süzöldükten sonra fırında 40°C'de kurutulmuştur. Metanol ekstraksiyonu için ise etanolla benzer ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Avokado yapraklarının her bir su özütünden, etanol ve metanol ekstraktından toplam fenolik madde miktarının analizi, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak kolorimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, toplam polifenol seviyesinin su ekstresi için 2707.3 µg GAE/g, etanol ekstresi için 2952.7 µg GAE/g ve metanol ekstresi için 1873.1 µg GAE/g olduğunu gösterdi. Ekstraksiyon verimleri (%) (a/a) ise su, etanol ve metanol ekstraktları için sırası ile 20.9, 16.8 ve 18.6 olduğu bildirilmiştir.

Oboh vd. (2016) *P. americana* yaprakları ve meyve çekirdeğinde toplam fenolik madde miktarını belirlemek için örnekleri kurutup toz hale getirdikten sonra, 1 g örnek 100 mL saf su içinde yaklaşık 24 saat boyunca ekstrakte etmişlerdir. Yaprak ve çekirdek ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 92.85 ve 57.10 mg GAE/g olarak spektrofotometre ile tespit edilmiştir. Ekstraktlarda DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi yaprak ve meyve çekirdeği ekstraktlarında sırası ile % inhibisyon (IC<sub>50</sub>) değerleri 25.21, 29.73 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Kumar ve Cumbal (2016) tarafından *P. americana* yaprakları, meyve kabuğu, meyvenin yenilebilir kısmı ve yağının fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; 5 g avokado yaprağı, kabuğu ve posası 50 mL suya eklenerek karışım 60-65°C'de 90 dakika ekstrakte edilmiştir. Avokado yağı karışımı, 25°C'de sabit karıştırma altında 25 mL'lik yuvarlak dipli bir şişeye 9 mL suya avokado yağı (50 µL) ve aseton (950 µL) karışımı eklenerek hazırlanmıştır. Yapraklar, meyve kabuğu, meyvenin yenilebilir kısmı ve yağının ekstraktlarının gallik asit eşdeğerine (GAE) göre DPPH radikal süpürme aktivitesi sırasıyla 32.60-32.73 µg/mL (% 84.46-80.12), 32.94-30.61 µg/mL (% 80.60-75.18), 7.96-1.07 µg/mL (% 22.53-6.51), 10.47-7.86 µg/mL (% 28.36-22.30) spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Yamassaki vd. (2017) 50°C'de bir laboratuvar fırınında kurutulup öğütülen avokado yaprakları, karanlıkta %70 etanol (100 g/500 mL) içinde 4 gün 25°C'de bekletilip ardından vakumla süzölmüştür. Daha sonra 40°C'de bir döner buharlaştırıcı kullanılarak konsantre edilip, dondurularak kurutulmuştur. Avokado yaprağı ekstraktlarının toplam fenolik içeriği 23.710 mg GAE/100 g km olarak bulunmuştur. Fenolik bileşiklerin tanımlanması amacıyla, HPLC analizi yapılmış ve C tipi prosiyanidinlerin yapraklarda bulunduğu bildirilmiştir.

Rahman vd. (2018) 50°C'de 24 saat boyunca kurutulup, toz hale getirilen *P. americana* yapraklarını %96'lık etanol çözgeni 1:10 (a/h) kullanılarak, 72 saat boyunca maserasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ekstrakt daha sonra buharlaştırıcı kullanılarak konsantre edilmiştir. Fitokimyasal analizler

sonucunda ekstraktların flavonoid bileşikleri, saponinler, tanenler ve steroidler içerdiği bildirilmiştir. Ekstraktların serbest radikalleri yakalama aktivitesi (DPPH) spektrofotometrik (absorbans DPPH: 0.797) yöntemle belirlenmiştir. Antioksidan aktivite sonuçları yaprak ekstraktı için % inhibisyon (IC<sub>50</sub>) değeri 72.61 mg/L ve C vitamini (kontrol grup) için 23.03 mg/L bulunmuştur.

Castro-Lopez vd. (2019) yedi Meksika avokado çeşidinden (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) olgun yapraklar (Platano, Criollo 6, Platano Delgado (PD), Criollo 1, Platano Temprano (PT), Campeon ve Todo el Año (TA)) 24 saat boyunca 50°C'de bir elektrikli ocakta kurutulup, ardından toz hale (2-5mm) getirilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon işlemi için her örnek (5g) 60mL etanol:su 35:65 (h/h) ile 40 dakika oda sıcaklığında (25°C'de) 40 kHz'de (%100 güç) ultrasonik su banyosuna daldırılmıştır. Partikülleri uzaklaştırmak için 4°C'de 15 dakika 3500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Ekstraktların saflaştırılması için 50°C'de 48 saat buharlaştırılarak ekstrakt kurutulmuştur. En yüksek serbest radikal süpürücü aktivite, DPPH ve ABTS radikalleri için Platano Delgado ve Criollo 6 avokado çeşitlerinde sırasıyla 271.86 µg/mL ve 269.56 µg/mL IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. *P. americana* yaprağı ekstraktlarında mevcut bileşikleri karakterize etmek için ultra performanslı sıvı kromatografisi cihazında elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış uçuş zamanlı kütle spektrometresi (UPLC-ESI-Q/TOF-MS<sup>2</sup>) kullanılarak analiz edilmiştir. Yedi avokado çeşidi arasında toplam otuz beş fenolik bileşik ve altı diğer polar bileşik bulunmuştur. İki ana alt sınıftan (hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler) toplam 11 fenolik asit bulunmuştur.

Rivai vd. (2019) *P. americana* yapraklarının kuru tozu yerel bir pazardan satın alınmıştır. Ekstraksiyon, hekzan için maserasyon yöntemi, aseton, etanol ve su çözücüleri için infüzyon yöntemi olmak üzere iki yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maserasyon yönteminde 50 g örnek 500 mL hekzan (1:10 a/h) olacak şekilde ara sıra karıştırılarak ilk 6 saat ısıtılıp, ardından 18 saat bekletilip daha sonra flanel kumaştan süzümüştür ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Tüm maseratlar toplanıp, daha sonra döner bir buharlaştırıcı ile ±40°C'nin altındaki bir sıcaklıkta, 500 mL'lik sıvı ekstrakt geri kazanılmıştır.

İnfüzyon yönteminde ise 50 g örnek 500 mL çözücü (aseton, etanol ve su) (1:10 a/h) su banyosunda 98°C'de 15-20 dakika ısıtılıp, süzülmüştür. *P. americana* yapraklarından hekzan, aseton, etanol ve sudan elde edilen ekstraktlardaki ikincil metabolit miktarları sırasıyla flavonoid için % 0.6, 0.3, 0.3 ve 0.5. Aseton, etanol ve su ekstraktı fenol bileşiklerinin miktarları sırasıyla % 5.1, 3.9 ve 3.7 bulunmuştur.

Che-Galicia vd. (2020) Meksika avokado çeşidinin (*P. americana* Mill. var. *drymifolia*) yapraklardan fenolik bileşiklerini ultrason destekli su ekstraksiyon sistemiyle elde ettikleri çalışmada 1:20 (a/h) oranında katı: çözücü oranı ile ve farklı zamanlarda (3, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 ve 60 dakika) ve 25 ± 1°C sabit sıcaklıkta karıştırılarak yapılmıştır. Ultrason destekli ekstraksiyonlar (%60 ve %100 güç) 880 W giriş gücü ve 37 kHz frekans ile çalışan ultrasonik banyo sisteminde test tüplerinde yapılıp, deneyler sırasında sıcaklığı sabit tutmak için bir soğutma banyosu sistemi ile ultrasonik banyo sistemi arasında sıcaklık kontrollü su devridaimi yapılmıştır. Geleneksel ekstraksiyon (%0 güç), bir homojenizatör kullanılarak 1000 rpm'de sürekli karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Fenolik içerik açısından maksimum ekstraksiyon (48.732 mg GAE/100 g km) 29.7 dakika ve % 84.5 elektrik gücünde tespit etmişlerdir. ABTS (22.143 mg TE/100 g km) için elde edilebilecek antioksidan aktivite için en yüksek tahmini sonuçlar 27.9 dakika ve % 81.2 elektrik gücünde tespit etmişlerdir.

Polat Köse vd. (2020) avokado (*Folium perseae*) yapraklarının liyofilize su ekstraktı için 50 g toz örnek 500mL kaynar su ile yarım saat karıştırılmıştır. Daha sonra süzülen filtrat -84°C'de bir dondurucuda dondurularak liyofilize edilmiştir (50°C, 5 mm-Hg). Avokado yapraklarının uçurulmuş etanol ekstraktı ise 50 g toz örnek 500mL etanol ile 1 saatin üzerinde karıştırılmıştır. Daha sonra süzülüp, 40°C'de buharlaştırılmıştır. Ekstraktlardaki fenolik bileşik içerikleri (mg/kg) sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (HPLC-MS) sistemi ile tespit edilmiş olup, avokado yaprağı liyofilize su ekstraktında herniarin (0.60 ± 0.06), kaempferol (50.15 ± 3.54), kuersitrin (15.10 ± 0.96), fumarik asit (59.18 ± 4.10), pirogalol (122.25 ± 8.14), kafeik asit (10.83 ± 2.14), klorojenik asit (28.83

$\pm 3.99$ ), luteolin-7-glukozit ( $1.08 \pm 0.11$ ), kaempferol-3-O-rutinosit ( $9.45 \pm 0.85$ ), rutin ( $26.05 \pm 1.71$ ), izorhamnetin ( $1.84 \pm 0.12$ ), avokado yaprağı etanol ekstraktında ise gallik asit ( $5.41 \pm 0.38$ ), herniarin ( $17.98 \pm 1.81$ ), kaempferol ( $663.54 \pm 46.83$ ), kuersitrin ( $58.61 \pm 3.74$ ), fumarik asit ( $214.32 \pm 14.86$ ), kafeik asit ( $32.74 \pm 6.48$ ), kuersetin-3-O-arabinosit ( $253.18 \pm 33.66$ ), kuersetin ( $16.20 \pm 2.15$ ), ellajik asit ( $5.56 \pm 0.37$ ), klorojenik asit ( $852.81 \pm 118.09$ ), rozmarinik asit ( $5.46 \pm 0.42$ ), luteolin-7-glukozit ( $43.15 \pm 4.39$ ), luteolin-5- glukozit ( $18.44 \pm 1.19$ ), kaempferol-3-O-rutinosit ( $25.45 \pm 2.30$ ), rutin ( $68.41 \pm 4.48$ ), izorhamnetin ( $34.37 \pm 9.33$ ) olarak saptanmıştır. Avokado yaprağı liyofilize su ve etanol ekstraktında DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi için sırası ile 240.40 ve 601.00  $\mu\text{g/mL}$   $\text{IC}_{50}$  değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir.

Murathan ve Kaya (2020) yaş Fuerte ve Hass çeşidi avokado yapraklarında ve meyvesinde bulunan fenoliklerin belirlenmesi için 5g örnek 50 mL metanol (% 80) ile homojenize edildikten sonra 24 saat dairesel çalkalamalı inkübatörde  $4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş ve sonrasında 10 dk süreyle 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant toplam flavanoid madde, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite ölçümlerinde kullanılmıştır. Çalışma sonucunda yaprak ekstraktlarının meyve ekstraktlarına oranla daha yüksek toplam fenolik madde, toplam flavanoid madde, toplam askorbik asit içeriği ile antioksidan kapasiteye sahip oldukları belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde içeriği Fuerte çeşidinin yaprak ekstraktlarında ( $352.3 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ) bulunmuştur. Fuerte yaprak ekstraktının ABTS radikali süpürücü aktivitesi % 60.5, DPPH radikali süpürücü aktivitesi % 51.4 olarak belirlenmiştir.

### **2.3. Enkapsülasyon ve Özellikleri**

Enkapsülasyon işlemi, bir aktif maddenin bir kapsülleme malzemesi, tercihen doğal bir polimer kullanılarak kapsüllendiği bir tekniktir. Başlıca amacı aktif maddeyi oksijen, ışık, sıcaklık, nem ve diğer dış koşulların etkisinden korumaktır. Amacı sağlık üzerine olumlu etkileri olan fonksiyonel bileşenler üzerinde koruyucu bir kabuk bariyeri sağlayarak etkili bir koruma yöntemidir. Fonksiyonel bileşenlerin kapsüllenmesi, aktif maddenin mükemmel koruma,

stabilizasyon, çözünürlük ve kontrollü salınım özelliklerini sağlar (Chew vd., 2019). Çoğunlukla farmasötik alanında (%68) uygulanmaktadır ve gıda endüstrisi yalnızca % 13'lük bir paya sahiptir fakat günümüzde yeni fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesinde fayda sağladığı için bu eğilim değişmektedir (Dias vd., 2017).

İnklüzyon kompleksleri elde etmek için hazırlama yöntemi, kapsülleme performansı ve ürünün morfometrik özelliklerini etkilediği için önemli bir role sahiptir. Siklodekstrinler-misafir kompleksleri hazırlamak için çok çeşitli yöntemler vardır, örneğin: çöktürme, yoğurma, süper kritik karbondioksit, öğütme, mikrodalga ışınlama ve püskürtmeli kurutma (Cid-Samamed vd., 2022). Siklodekstrinler; gıda endüstrisinde gıda katkı maddeleri olarak, tatların stabilizasyonu için, istenmeyen tatların veya kolesterol gibi diğer istenmeyen bileşiklerin ortadan kaldırılması ve mikrobiyolojik kontaminasyonları ve esmerleşme reaksiyonlarını önlemek için yaygın olarak kullanılan siklik oligomerlerdir (Astray vd., 2009). Siklodekstrinler (SD)  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağlı glikoz ünitelerinden oluşan siklik maltooligosakkaritlerdir. Glikoz ünitesinin sayısına göre isimlendirilen siklodekstrinlerin en çok kullanılan ve bilinenleri, sırası ile, 6, 7 ve 8 glikoz ünitesinden oluşan  $\alpha$ -SD,  $\beta$ -SD ve  $\gamma$ -SD' lerdir. Geometrik olarak 3 boyutlu konik silindir biçiminde olan siklodekstrinlerin kavite denen iç kısımları hidrofobik, dış yüzeyleri ise hidrofilik özellik gösterir (Avcı ve Dönmez, 2010).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, siklodekstrin inklüzyon kompleksleştirme yöntemi, flavonoidlerin (Yang vd., 2011; Zu vd., 2014; dos Santos Lima vd., 2019), fenoliklerin (Mantegna vd., 2012; Da Rosa vd., 2014; Cetin Babaoglu vd., 2017; Lakka vd., 2020) aroma bileşiklerinin (Ciobanu vd., 2013) kapsüllenmesinde başarılı olduğu bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen avokado yaprağı ekstraktı ile enkapsülasyon üretimi hedeflenmiştir. Avokado yaprakları ile ilgili yapılan enkapsülasyon çalışmalarında inklüzyon kompleksi yönteminin uygulandığı enkapsülasyon ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır ve

avokado yapraklarının enkapsülasyonu ile ilgili yapılan bir çalışma aşağıda detaylı olarak verilmiştir:

Plazola-Jacinto vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada liyofilize edilmiş *Hass* ve *drymifolia* (Creole) çeşitlerinin avokado yaprakları klorofilleri ve karotenoidleri ekstrakte etmek için 1:100 (a/h) oranında yenilebilir mısır ve aspir yağları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon yöntemi, emülsiyon oluşturma metodu uygulamasıyla elde edilmiştir. Her bir yağ ekstraktı, 1:4 (a/a) oranında bir duvar malzemeleri çözeltisi (10 g arap zamkı ve 100 mL damıtılmış su içinde çözülmüş 10 g maltodekstrin) ile karıştırılıp hazırlanan emülsiyonlar 3 dakika homojenize edilmiştir. Mısır yağı özleri, aspir yağı özlerine kıyasla daha yüksek karotenoid (>%10), klorofil a (yaklaşık %5) ve klorofil b (>%40) içeriği bildirilmiştir. Ancak mısır yağı mikrokapsüllerinin (15.70-18.34 g su/ 100 g kuru kapsül) higroskopiklik değerleri mikrokapsülenmiş yağı açığa çıkaran duvar malzemelerinin çözünmesine ve örnek renginin beyazdan soluk sarıya dönmesine neden olduğu tespit edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskopunda (SEM), elektronlar ve maddeler arasındaki etkileşimleri takiben yüzey morfolojisini belirlemek için kullanılabilir ve inklüzyon komplekslerinin oluşumunu izlemek için yardımcı bir yöntem sağlar (Ho vd., 2017). Siklodekstrinlerin biyoaktif bileşiklerle inklüzyon kompleksi oluşturma yeteneğinin morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelendiği çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Kuersetin-siklodekstrin ikili sistemlerinin 1:1 oranında 2-hidroksipropil  $\beta$ -siklodekstrin ve  $\beta$ -siklodekstrin kaplama materyali kullanılarak liyofilizasyon yöntemi ile elde edilen kapsüllerin, kaplama materyallerinin ve kuersetinin SEM analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizinden elde edilen sonuca göre kuersetinin kendi başına iğne benzeri kristal oluşturduğu,  $\beta$ -siklodekstrinin düzensiz şekilli kristaller oluşturduğu, 2-hidroksipropil  $\beta$ -siklodekstrinin büzülmüş silindirik küreler oluşturduğu bildirilmiştir (Pralhad ve Rajendrakumar, 2004).

$\beta$ -siklodekstrin ile nano-kapsüllenmiş kateşinin karakterizasyonunda,  $\beta$ -siklodekstrinin eşit olmayan boyuta sahip olduğu, belirgin kristal yapı gösterdiği ve yapısının düzensiz olduğu bildirilmiştir (Krishnaswamy vd., 2012).

Yapılan bir başka çalışmada likopen,  $\beta$ -siklodekstrin ve likopen/ $\beta$ -siklodekstrin inklüzyon komplekslerini yüzey morfolojisi ile incelemişler. Saf likopen blok yapılı düzensiz şekilli parçacıklar iken,  $\beta$ -siklodekstrin farklı boyutlarda elipsoidal form sergilemiştir (Wang vd., 2019).

Üzüm çekirdeği ekstraktı ile 2-hidroksipropil  $\beta$ -siklodekstrinin inklüzyon kompleksinden üretilen kapsüllerin SEM analizinden elde edilen sonuca göre; ekstrakt iğnemsisi bir eşkenar dörtgen kristal morfolojisi sergilerken, 2-hidroksipropil  $\beta$ -siklodekstrinin küresel bir şekil oluşturduğu ve her iki form da düzensiz bir blok yapısı gözlemlenmiştir. Konuk moleküllerin siklodekstrinler içine dahil edilmesi üzerine, konuk moleküllerin kristalliğindeki bir kayıp nedeniyle inklüzyon kompleksinin yüzeyinin büyük ölçüde değiştiği bildirilmiştir (Li vd., 2019).

### 3. MATERYAL VE METOT

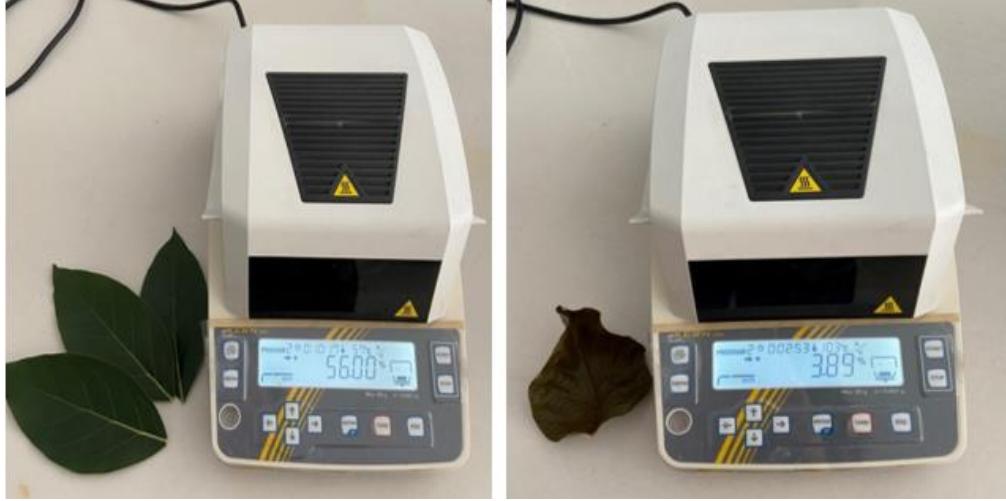
#### 3.1. Materyal

Fuerte avokado (*Persea americana* Mill.) çeşidi ağacının yaprakları Antalya'nın Gazipaşa İlçesi Ekmel Mahallesiinde (koordinatlar: 36°15'28.5"N 32°19'59.2"E) tam verimde ve 6 x 6 m dikim mesafesinde kurulu Fuerte, Hass, Pinkerton ve Bacon avokado çeşitlerinin ekili olduğu 7000 m<sup>2</sup>'lik bahçeden araştırma materyali olarak temin edilmiştir. Yaprakların toplanması ağaçların meyvelerinin hasat döneminden sonra yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Avokado (*Persea americana* Mill.) çeşidi ağacı yaprakları

Yapraklar toplanıp temizlendikten sonra hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve bekletilmeden hemen kurutma işlemi uygulanmıştır. Kurutma işlemi öncesinde yaklaşık 3 g yaş avokado yaprağı örneği hızlı nem tayin cihazına (Radway, Polonya) konularak % nem içeriği hesaplanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Yaş ve kuru avokado yaprağının nem tayin cihazında nem oranının hesaplanması

Kurutma işlemi için sırasıyla avokado yaprakları dışındaki sap ve kusurlu (çürümüş ve kurumuş) yapraklar ayıklanmış, nemli bir bez ile yüzeyi temizlenmiş ve kurulanmıştır.



Şekil 3.3. Ayıklama, temizleme ve kurulum işlemlerinden sonra kurutma için tepsilere üst üste gelmeyecek şekilde konulmuş ve kurutulmuş avokado yaprakları

Avokado yaprakları 60°C'de %10 nem miktarının altına ininceye kadar havalı kurutucuda (Mikrotest, Ankara) kurutulmuştur (Şekil 3.3). Kurutma işlemi sonrası %nem miktarı, hızlı nem tayin cihazı (Radway, Polonya) ile %4.00 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Kurutma işlemi sonrasında elde edilen kuru yapraklar ve laboratuvar tipi bir parçalayıcı kullanılarak öğütülmesi ve elekten geçirilmesi

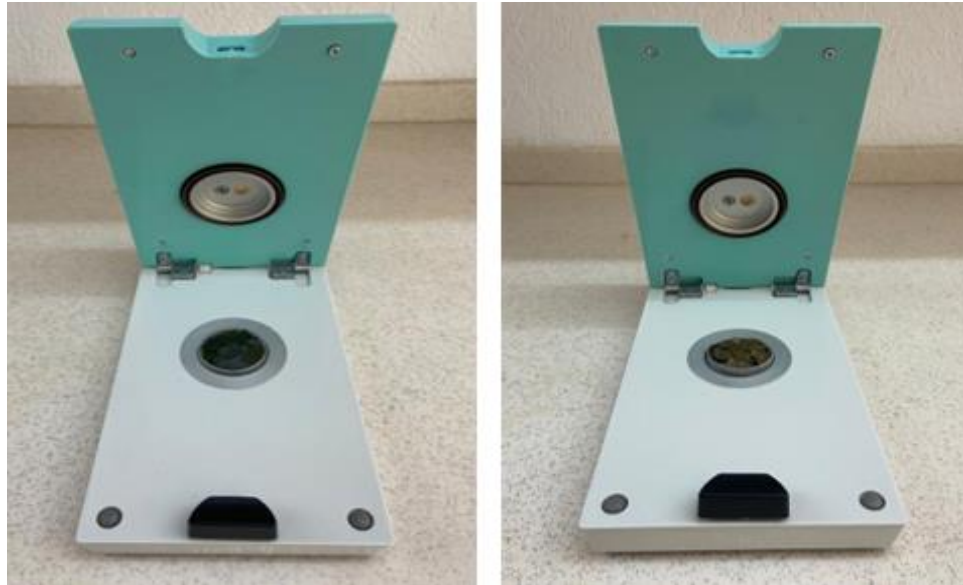
Ekstraksiyon uygulamasına başlamadan önce kurutulan avokado yaprakları laboratuvar tipi bir parçalayıcı (Waring Commercial Laboratory Blender, ABD) kullanılarak öğütülmüştür. Öğütülen kuru yapraklar farklı gözeneklere sahip raflı eleklerden (Kocintok, Türkiye) geçirilmiştir (Şekil 3.4). 0.5 mm'lik elekten geçip öğütülen numuneler poliamid/polietilen poşetlerde vakum altında paketlenerek ekstraksiyon işlemine kadar -45°C'da depolanmıştır.

Bu tez çalışmasında; sodyum klorür (Sigma-Aldrich, Almanya), sodyum karbonat (Sigma Aldrich, Almanya), gallik asit (Sigma Aldrich, Çin), Tris-HCL (Merck KGaA, Almanya), Trolox® (Sigma Aldrich, ABD), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma Aldrich, Almanya), metanol (Sigma Aldrich, İsrail),  $\alpha$ -siklodekstrin (İsviçre), Folin & Ciocalteu fenol reaktifi (Merck KGaA, Almanya), klorojenik asit (Sigma Aldrich, ABD), kuersetin, luteolin, protokateşik asit, kafeik asit, kateşin, epikateşin, şirincik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik, *o*-kumarik, kamferol, benzoik asit, eriodiktiol, sinamik asit, apigenin, protokateşik asit, rutin, rosmarinik asit, hesperidin, ferulik asit, (Fluka, ABD) kimyasalları kullanılmıştır.

## 3.2. Metotlar

### 3.2.1. Su Aktivitesi

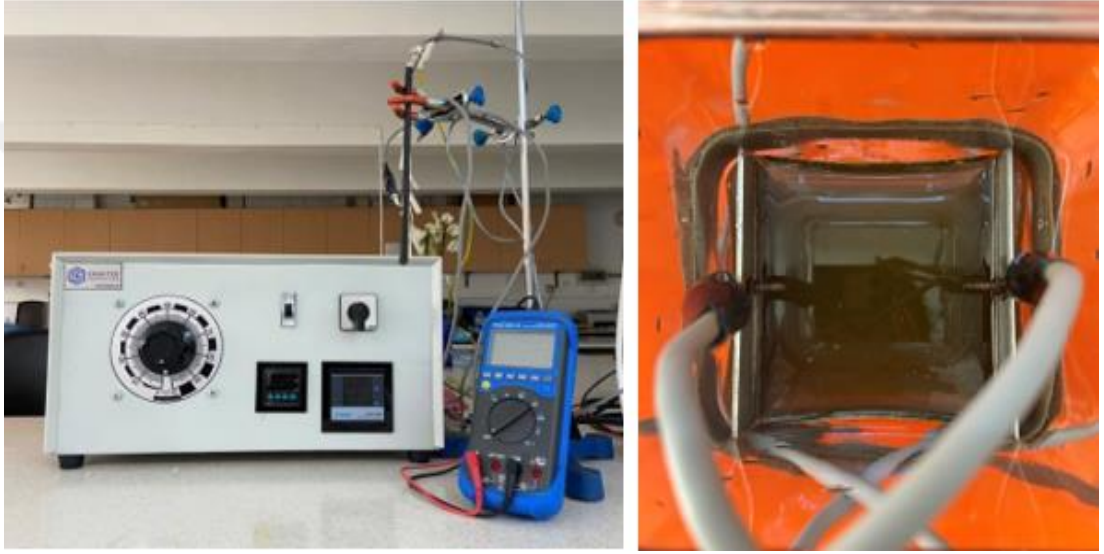
Taze ve kurutulmuş avokado yapraklarının su aktiviteleri ( $a_w$ ) thermoconstanter TH 200 (Novasina, Axair Ltd., İsviçre) su aktivitesi tayin cihazı kullanılarak oda sıcaklığında belirlenmiştir (Şekil 3.5). Okuma yapılırken farklı yaprakların seçilmesine özen gösterilmiştir. Denemeler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. Taze ve kurutulmuş avokado yaprağı örneklerinin su aktivitesi cihazı ile  $a_w$  değerlerinin belirlenmesi

### 3.2.2. Ohmik Isıtma Destekli Ekstraksiyon İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Kurutulmuş ve öğütülmüş Fuerte avokado (*Persea americana* Mill.) çeşidi yaprakların fenolikçe zengin ohmik ısıtma destekli (Eraktek İnovasyon, Konya, Türkiye) ekstraksiyon (Şekil 3.6) optimizasyonu için yanıt yüzey metodu (RSM) ve deneysel tasarım için merkezi karma tasarımı (Central Composite Design, CCD) uygulanmıştır.



Şekil 3.6. Ohmik ısıtma cihazı

Optimum katı/çözücü oranının (g/500 mL) belirlenmesinde Khajehei vd. (2017) tarafından tanımlanan yöntem üzerinde yapılan bazı modifikasyonlarla ön denemeler sonucunda optimum ekstraksiyon işlem parametreleri olarak voltaj gradyanı (18.75 V/cm), süre (10 dk) ve sıcaklık (95°C), % 0.30 NaCl-su (a/h) uygulanmıştır. Ekstraksiyon işleminde çözeltiliye temas edecek şekilde cam kavanozda karşılıklı yerleştirilen elektrik akımını ileticek olan iki paslanmaz çelik elektrot (5×6cm, elektrot aralığı 8cm) arasında konumlandırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi öncesi 10 dakika boyunca NaCl-su çözgeni ile kurutulup toz hale getirilen yapraklar (2.50, 3.75, 5.00, 7.50, 10.00 g) ıslatılmıştır. Süre biter bitmez ekstraksiyon işlemi için cihaz açılmıştır. Kaynama noktasına ulaştıktan sonra 10 dakikalık ekstraksiyon süresi beklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonlandırıldıktan sonrası çözeltilerin son sıcaklık değerleri kaydedilmiştir. Daha

sonra örnekler Whatman No.1 filtre kağıdından iki kez süzülüp, 10 dakika süreyle 4000rpm' de santrifüjlendi (Sigma Laborzentrifugen D-37520, Almanya). Yapılan ön denemenin analizleri sonucunda en yüksek toplam fenolik madde miktarı ve % ekstrakt verimi, bağımsız değişkenden katı/çözücü oranınının 5 g/500mL olduğu bulunmuştur.

Çalışmada çözücü olarak, toksik etkisi olmayan saf su tercih edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde tuz kullanılmasının sebebi iletkenlik olmadığına ohmik ısıtmanın etkisi düşmekte ve sıcaklık yavaş bir şekilde yükselip ekstraksiyon süresi uzamaktadır (Kusnadi ve Sastry, 2012). Bu kapsamda tuz konsantrasyonunun belirlenmesi için ön deneme olarak önce ohmik ısıtma ile %0 NaCl konsantrasyonunda avokado yapraklarından fenolik su ekstraksiyonu yapılmıştır. Öğütülmüş 5 g toz avokado yaprağı 500 mL saf su ile ohmik ısıtma ekstraksiyonunda 95°C sıcaklıkta, 18.75 V/cm voltaj değerinde alternatif akım uygulanarak ekstrakte edilmiştir. Yapılan daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi işlem süresi uzamış olup 120 dk sürmüştür. Ön denemelerde çalışılan % 0.15, 0.20 ve 0.30 tuz (NaCl) konsantrasyonlarının alternatif akım üzerinde meydana getirdiği değişiklikler tespit edilmiş ve % 0.2 ile %0.3 tuz konsantrasyonlarında alternatif akım kısa bir sürede 8.5 A değerinin üzerine çıkmıştır. En iyi oran iletkenlik için % 0.15 tuz olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde Turgut (2018) tarafından yapılan çalışmada da tasarlanan ohmik ısıtma sisteminin en fazla 10 A değerinde çalışılabildiği tespit edilmiştir.

Yukarıda verilen ön deneme sonuçlarından yola çıkarak merkezi karma deneysel tasarımında (CCD) kullanılan bağımsız değişkenlerin minimum (-1) ve maksimum (1) faktör seviyeleri çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri

Bağımsız Değişkenler	Faktör Seviyeleri				
	-1.41	-1	0	1	1.41
X1: Voltaj Gradyanı (V/cm)	9.38	10.75	14.06	17.38	18.75
X2: Süre (dk)	1	2.3	5.5	8.7	10

Avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonu için 2 adet merkezi nokta içeren 13 farklı uygulamaya ait merkezi karma deney tasarımı ise Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Merkezi karma deneysel tasarımı

Uygulama No <sup>a</sup>	X1	X2	Voltaj Gradyanı (V/cm)	Süre (dk)
1	1	1	17.38	8.7
2	0	-1.41	14.06	1.0
3	-1.41	0	9.38	5.5
4	0	0	14.06	5.5
5	0	0	14.06	5.5
6	0	1.41	14.06	10.0
7	-1	-1	10.75	2.3
8	0	0	14.06	5.5
9	0	0	14.06	5.5
10	1	-1	17.38	2.3
11	0	0	14.06	5.5
12	-1	1	10.75	8.7
13	1.41	1	18.75	5.5

<sup>a</sup> Rastgele seçilmiş

Deney verileri Minitab İstatistiksel Yazılımı (Minitab 20.0) kullanılarak analiz edilmiş, model yeterliliği ve regresyon testleri  $R^2$  ve düzeltilmiş  $-R^2$  değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Yanıt yüzeyleri ve tasarımları yaklaşımında modeller iki değişkenli ikinci dereceden eşitliğe göre belirlenmiştir. Yanıt olarak ekstraksiyon verimleri ile ekstraktların toplam fenolik madde (TFM) ve DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi kullanılmıştır.

Karşılaştırma yapmak için avakado yapraklarına geleneksel yöntem ile ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Öğütülmüş 5 g avokado yaprağı 500 mL saf su ile ohmik ısıtma ekstraksiyonunda sıcaklık olarak belirlenen 95°C kullanılmış olup 120 dk boyunca geleneksel yöntem ile ekstrakte edilmiştir. Geleneksel yöntemle ekstrakte edilen örnekler süzülüp, santrüfjü edildikten sonra % ekstrakt verimi ile ekstraktların toplam fenolik madde (TFM) ve DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemi üç tekerrür halinde yapılmıştır.

### 3.2.3. Ekstrakt Veriminin Belirlenmesi

Merkezi karma deney tasarımı kullanılarak avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonu ile elde edilen örnekler süzölmüş ve santrifüj (Sigma, Almanya) yapılmıştır. Süzöntüden alınan 5 mL örnekle etüvde 105 °C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Tartım sonrası ekstrakt verim miktarı % (g ekstrakt/100 g yaprak) olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.7). Analizler iki paralel olacak şekilde yapılmıştır.

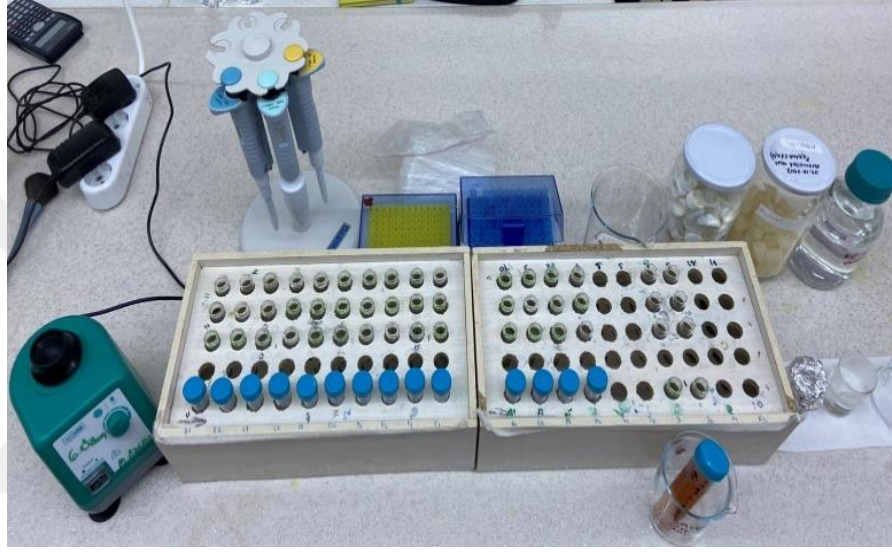


Şekil 3.7. Sabit ağırlığa gelmiş avokado yaprak ekstraktlarının bulunduğu cam petriler

### 3.2.4. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Merkezi karma deney tasarımı kullanılarak avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonu ile elde edilen örnekler ile enkapsüle örneklerin toplam fenolik madde (TFM) miktarları Folin & Ciocalteu yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Guo vd., 2006). Enkapsüle toz örneklerden ekstraksiyonda 1 g örnek tartılarak 3 mL saf suda ultrason destekli ekstraksiyon cihazında %100 güçte 5 dak. ekstrakte edilmiş, santrifüj sonrası elde süzöntü analizde kullanılmıştır. Ekstraktlardan 0.4 mL alınıp bir tüp içerisine pipetlenmiş ve ardından 10 kat seyreltilmiş olan 2 mL Folin & Ciocalteu reaktifi ilave edilerek vortekslenmiştir (Wisd, Kore). Daha sonra üzerine 1.6 mL

%7.5'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek tekrar vorteks ile karıştırılmıştır (Şekil 3.8). Karışım karanlıkta bir saat bekletildikten sonra, çözeltinin absorbansı şahit çözeltiliye karşı 765 nm dalga boyunda spektrofotometre (T70+UV/VIS spectrophotometer, PG Instruments, İngiltere) ile ölçülmüştür. Sonuçlar gallik asitten hazırlanmış çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi ( $y=0.9171x+0.2439$ ;  $R^2=0.9975$ ) kullanılarak ekstrakt için mg GAE/100g km ve kapsül için mg GAE/100g ekstrakt değerleri hesaplanmıştır. Analizler üçer paralel olacak şekilde yapılmıştır.



Şekil 3.8. Ekstraksiyon koşullarında elde edilen örneklerde toplam fenolik madde tayini

### 3.2.5. DPPH Serbest Radikalleri Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

Merkezi karma deney tasarımı kullanılarak avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraktları, sıcak su ekstraktları ve enkapsüle toz örnek ekstraktlarının antioksidan aktivitesi Dorman vd. (2003) tarafından yayınlanmış olan (DPPH) serbest radikal yakalama aktivitesi tayini kullanılarak tespit edilmiştir. Enkapsüle toz örneklerden ekstraksiyonda 1 g örnek tartılarak 3 mL saf suda ultrason destekli ekstraksiyon cihazında % 100 güçte 5 dakika ekstrakte edilmiş, santrifüj sonrası elde süzöntü analizde kullanılmıştır. Fenolik ekstraktlarından 50 µL alınıp bir tüp içerisine pipetlenmiş ve üzerine 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH:7.4) eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışıma 1.00 mL DPPH (0.10 mM, metanol içerisinde) çözeltisinden

ilave edilerek karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon süresinin bitiminde çözeltinin 517 nm'deki absorbanı spektrofotometrede okunmuş ve kontrol olarak fenolik ekstraktı yerine saf su kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktların DPPH aktivitesi aşağıdaki formülden (3.1) yararlanarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon (DPPH)} = [(Abs_{\text{Kontrol}} - Abs_{\text{Örnek}}) / Abs_{\text{Kontrol}}] * 100 \quad (3.1)$$

Burada  $Abs_{\text{Kontrol}}$  ve  $Abs_{\text{Örnek}}$  sırasıyla kontrol ve örnek için okunan absorban değerlerini temsil etmektedir.

Sonuçlar Trolox® standardı ile hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin spektrofotometrede 517 nm'de elde edilen absorban değerleri kalibrasyon eğrisi ( $R^2=0.9973$ ) kullanılarak ekstrakt ve kapsüller için mg TE/100g km hesaplanmıştır. Analizler üçer paralel olacak şekilde yapılmıştır.

### **3.2.6. Fenolik Bileşiminin HPLC ile Belirlenmesi**

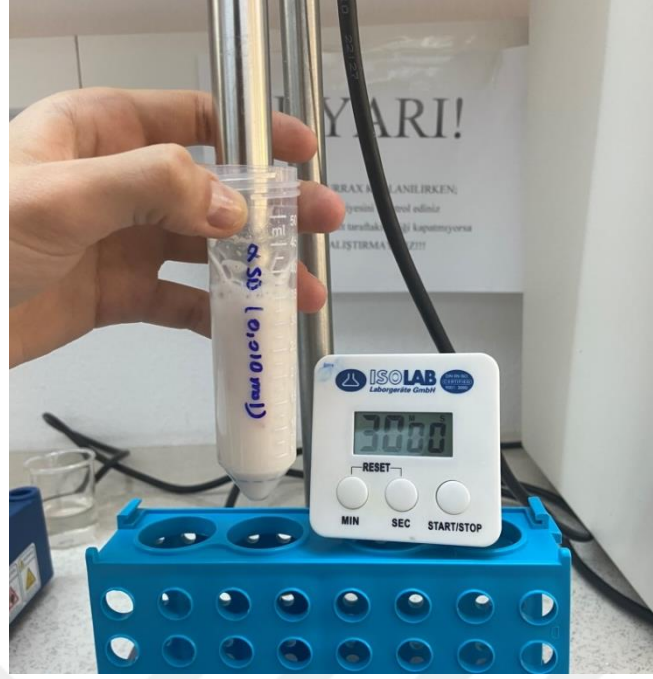
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ve diode array dedektör (DAD) (Shimadzu, Japonya) kullanılarak optimum ekstrakt ve optimum ekstraktan elde edilen kapsüllerin fenolik bileşimleri belirlenmiştir. Merkezi karma deney tasarımı kullanılarak avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonu ile optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen örnekler süzülüp santrifüj edildikten sonra süzüntü mikropor filtreden geçirilerek (0.45  $\mu\text{m}$ ) cihaza enjekte edilmiştir. Toz kapsüllerin ekstraksiyonunda ise 1 g tartılan örnek 3 mL saf suda ultrason destekli ekstraksiyon cihazında %100 güçte 5 dak. ekstrakte edilip, santrifüj edilmiş ve süzüntü mikropor filtreden geçirilerek (0.45  $\mu\text{m}$ ) cihaza enjekte edilmiştir. Çalışmada zıt faz (reversed-phase) Agilent Eclipse XDB-C18 (kolon uzunluğu x iç çapı: 250x4,60 mm, partikül boyutu: 5  $\mu\text{m}$ ) analitik kolon ve Agilent Eclipse XDB C18 koruyucu (guard) kolon (kolon uzunluğu x iç çapı: 4.6 x 12.5 mm, partikül

boyutu: 5 µm) kullanılmıştır. Dalga boyu 278 nm, akış hızı 0.8 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 20 µl ve kolon fırın sıcaklığı 30 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Mobil faz olarak A: %2.0 asetik asit: distile su ve B: kromatografik saflıkta metanol kullanılmıştır. Fenolik maddelerin profili kademeli elüsyon (gradient) programı kullanılarak belirlenmiştir (Caponio vd., 1999).

Standartların tespit limiti (limit of detection- LOD) ve tayin limiti (limit of quantification-LOQ) alıkonma zamanı sırasıyla protokateşik asit için 0.05 ve 0.16 µg/mL, gallik asit için 0.01 ve 0.02 µg/mL, kateşin için 0.05 ve 0.16 µg/mL, klorojenik asit için 0.02 ve 0.07 µg/mL, p-hidroksibenzoik asit için 0.005 ve 0.01 µg/mL, kafeik asit için 0.02 ve 0.05 µg/mL, şirincik asit için 0.01 ve 0.02 µg/mL, (-)-epikateşin için 0.05 ve 0.15 µg/mL, p-kumarik asit için 0.01 ve 0.03 µg/mL, benzoik asit için 0.06 ve 0.19 µg/mL, apigenin için 0.03 ve 0.08 µg/mL, ferulik asit için 0.01 ve 0.02 µg/mL, o-kumarik asit için 0.005 ve 0.01 µg/mL, hesperidin için 0.02 ve 0.06 µg/mL, rutin için 0.06 ve 0.18 µg/mL, rosmarinik asit 0.03 ve 0.19 µg/mL, sinamik asit 0.01 ve 0.03 µg/mL, eriodiktiol için 0.03 ve 0.08 µg/mL, kuersetin 0.11 ve 0.32 µg/mL, kamferol için 0.02 ve 0.06 µg/mL, luteolin için 0.03 ve 0.10 µg/mL'dir. Ekstrakta ve kapsülde bulunan fenolik bileşiklerin miktarı ise fenolik kalibrasyon eğrileri kullanılarak mg/100g km olarak hesaplanmıştır. Analizler üçer paralel olacak şekilde yapılmıştır.

### **3.2.7. Avokado Yaprağı Ekstraktının α-Siklodekstrin ile Enkapsüle Edilmesi**

Optimum ekstraksiyon koşullarında ekstrakte edilen sulu örnekler süzölmüş ve santrifüj edilerek enkapsülasyon için berrak üst faz kullanılmıştır. Enkapsülasyon işlemi için kaplama materyali olarak α-siklodekstrin kullanılmıştır. Optimum ekstraktın içerisinde farklı mol oranlarında kaplama materyali olan α-siklodekstrinin homojenize (Şekil 3.9) edilmesi ile aşağıdaki yöntem izlenerek enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir.



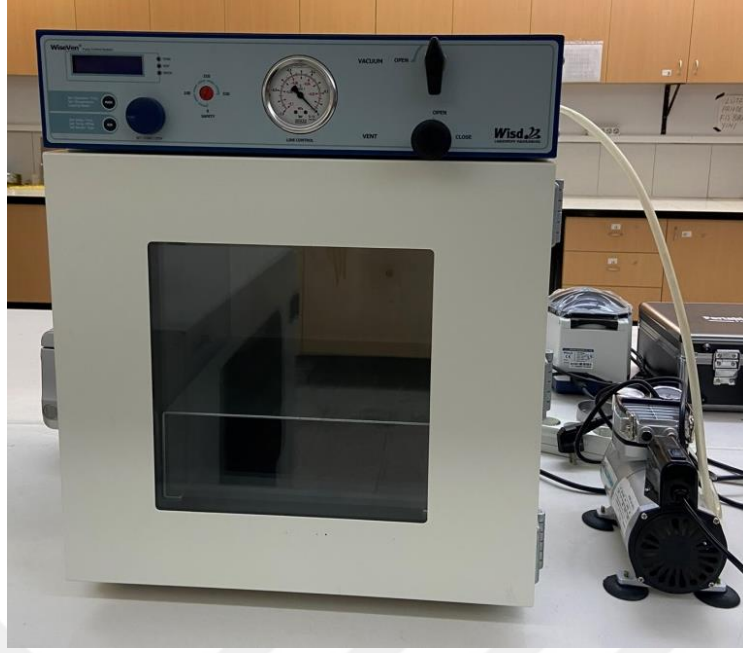
Şekil 3.9.  $\alpha$ -Siklodekstrin ile optimum ekstraktın homojenizasyon işlemi

Enkapsülasyon işleminde kullanılacak  $\alpha$ -siklodekstrin oranları 0.0025 mol, 0.0050 mol, 0.0075 mol ve 0.0100 mol olacak şekilde toz  $\alpha$ -siklodekstrinler, 10 mL hacimde optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen avokado yaprağı ekstraktına eklenip, Ultra Turrax (Ika, Staufen, Almanya) ile 2500 rpm'de 30 dk boyunca homojenize edilmiştir (Zong ve Bi, 2012). Çizelge 3.3'te avokado ağacı yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonunun  $\alpha$ -siklodekstrin ile oluşturulan enkapsülasyon deneme deseni detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Avokado ağacı (*Persea americana* Mill.) yapraklarından ohmik ısıtma destekli NaCl-su ekstraksiyonunun  $\alpha$ -siklodekstrin ile oluşturulan enkapsülasyon deneme deseni

$\alpha$ -Siklodekstrin: Ekstrakt Oranı (mol)	$\alpha$ -Siklodekstrin Miktarı (g/10mL ekstrakt)	Kuru Ekstrakt (g/100mL)
0.0025	2.43	0.425
0.0050	4.86	0.425
0.0075	7.29	0.425
0.0100	9.72	0.425

Homojenizasyon işlemi uygulanan çözelti daha sonra cam petrilere aktarılıp 40°C'de 0,5 bar basınçta 0.6  $a_w$ 'nin altına ininceye kadar vakumlu kurutucuda (WiseVen, Kore) kurutulmuştur (Şekil 3.10).



Şekil 3.10.  $\alpha$ -Siklodekstrin ile optimum ekstraktın enkapsülasyon işlemi

Kurutma işleminden sonra hazırlanan kapsüller porselen havanda ezilerek öğütülmüştür. Öğütülen toz kapsüller 0.5 mm'lik elekten (Kocintok) geçirilip amber şişelerde hava almayacak şekilde ağzı kapatılarak analizlere kadar oda koşullarında 25°C'de depolanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Kurutulan kapsüllerin toz hale getirilme işlemi

### **3.2.8. Enkapsüle Örneklerin Nem İçeriği ve Su Aktivitesi Analizleri**

Avokado yaprağı ekstraktı içeren kapsüllerin % nem miktarı, hızlı nem tayin cihazı (Radway, Polonya) ile belirlenmiştir. Avokado yaprağı ekstraktı içeren kapsüllerin su aktiviteleri ( $a_w$ ) thermoconstanter TH 200 (Novasina, Axair Ltd., İsviçre) su aktivitesi tayin cihazı kullanılarak oda sıcaklığında belirlenmiştir. Analiz 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.9. Enkapsüle Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi**

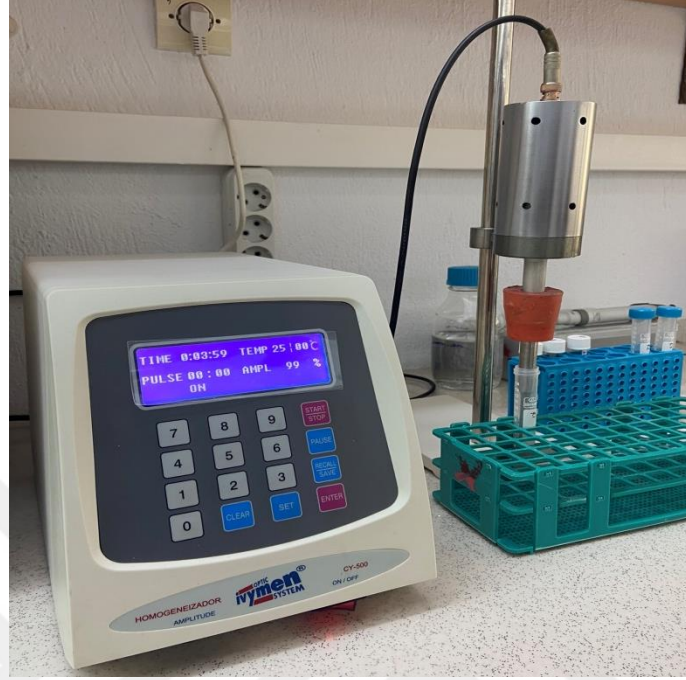
Avokado yaprağı ekstraktı içeren kapsül örnekleri, taramalı elektron mikroskopunun (SEM) (FEI Quanta 250 FEG, Çek Cumhuriyeti) çalışma gereksinimlerine göre ön hazırlık yapıldı. Kapsüllerin % nem miktarları liyofilizasyon işlemi uygulanarak %10 nem içeriğinin altına düşürülmesi hedeflendi. Bu kapsamda örnekler önce 12 saat boyunca  $-40^{\circ}\text{C}$ 'de ön soğutma işlemi uygulandı. Daha sonra vakum altında (Vacubrand, Almanya) 12 saat boyunca liyofilizasyon cihazında (Heto Drywinner DW 3, Danimarka) dondurularak kurutuldu.

Kapsüller çift boyutlu bir yapışkan bant kullanılarak SEM kütüklerinin üzerine yerleştirildi. Yüzey morfolojisi SEM kullanılarak analiz edildi ve cihazda geniş alan dedektörü (LFD) ile 10 kV'luk bir hızlandırma voltajında ve düşük vakum altında görüntüleme 5000x büyütme ile gerçekleştirildi.

### **3.2.10. Enkapsülasyon Etkinliği**

Enkapsülasyon etkinliği (%EE), toz kapsüllerin içerisine enkapsüle edilen toplam fenolik maddenin yaprak ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarına oranlanması ile Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Kapsüllerin etkinliği için birebir referans alınacak bir metot bulunmamaktadır. Bu kapsamda ön çalışma gerçekleştirilmiştir. 1 g toz kapsüllere 3 mL saf suda %100 güçte 5 dak. boyunca ultrason destekli ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır

(Şekil 3.12). Ekstraksiyon işleminden sonra hazırlanan çözelti 4000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilip analizlerde kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Ultrason destekli ekstraksiyon işlemi

Kapsül çözeltisi Folin & Ciocalteu yöntemi kullanılarak polifenol içeriği saptanmıştır (Najafi-Soulari vd., 2016).

$$EE \% = (We/Wt) \times 100 \quad (3.2)$$

Burada, We enkapsüle edilmiş örneklerin polifenol miktarını, Wt ise ekstraktın polifenol miktarını temsil etmektedir.

### 3.3. İstatistiksel Analizler

Ekstraksiyon ön deneme uygulamaları tam şansa bağlı deneme planına göre 2 tekerrür, analizler ise 3 paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistik değerlendirilmesinde SPSS 20.0 İstatistik Programı kullanılmış olup, muameleler arasındaki farkın önemi varyans analiziyle tespit edilmiştir. Önemli farklılıkların belirlenmesinde ise Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Avokado yapraklarının ekstraksiyonu için, elde edilen yanıtların değerlendirilmesi ve optimum noktaların bulunabilmesi için Minitab paket programı yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılmıştır.

Deney verileri Minitab istatistiksel analiz yazılımı (Minitab 20.0) kullanılarak analiz edilmiş ve modelin performansı  $R^2$  değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Merkezi karma deney tasarımı (CCD) model tasarımında kullanılmıştır. Model iki değişkenli ikinci dereceden eşitliğe göre değerlendirilmiştir (Eşitlik 3.3).

$$Z = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{i=j+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.3)$$

Eşitlikte  $Z$  bağımlı değişken,  $X$  bağımsız değişken,  $\beta_0$  sabit katsayı,  $\beta_i$  birinci dereceden (doğrusal) denklem katsayısı,  $\beta_{ii}$  ikinci dereceden denklem katsayısı ve  $\beta_{ij}$  iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısı olarak belirlenmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Avokado yaprakları içerdiği zengin antioksidan biyoaktif bileşenler ve besin öğeleri ile insan bağışıklık sistemini güçlendiren, dolayısıyla literatürlerde antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik, antidiyabetik ve antitümör vb. özellikleri bildirilen bir yapraktır.

Yukarıdaki bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında, yanıt yüzey metodu ve merkezi karma deney tasarımı ile Fuerte çeşidi avokado yaprağı biyoaktif bileşenlerinden fenolik maddelerin ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyonu ile optimize edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, optimum koşullarda ekstrakte edilen avokado yaprağı su ekstraktlarının  $\alpha$ -siklodekstrin ile inklüzyon kompleksi oluşturularak enkapsüle edilen toz kapsüller ile enkapsülasyon öncesi su ekstraktlarının fizikokimyasal özelliklerinin, biyoaktif bileşenlerinin , fonksiyonel özelliklerinin (antioksidan) ve toz kapsüllerde morfolojik özelliğın (SEM) belirlenmesi hedeflenmiştir.

##### 4.1. Taze ve Kuru Avokado Yapraklarının Bazı Fizikokimyasal Özellikleri

Avokado yapraklarının kurutma öncesi yaş ve kurutma sonrası kuru olmak üzere avokado yapraklarında su aktivitesi ve nem içeriğı (%) değerleri belirlenmiş olup Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yaş ve kurutulmuş avokado yapraklarının bazı fizikokimyasal özellikleri

	Yaş yaprak	Kuru yaprak
Su aktivitesi	0.880±0.008	0.395±0.010
Nem miktarı (%)	53.49±0.52	3.91±0.12

#### 4.2. Yaprak Ekstraktlarının Verim, Toplam Fenolik Madde ve DPPH Miktarlarının Ekstraksiyon Modellemesi

Fuerte çeşidi avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraktlarının farklı ekstraksiyon koşullarındaki ekstrakt verimi (%), toplam fenolik madde (mg GAE/100g km) ve DPPH serbest radikalleri yakalama (mg TE/100 g km) aktivitesinde meydana gelen değişimlere ait model katsayılar değerlendirme sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Avokado yaprağı ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstrakt verimi (%), TFM (mg GAE/100g km) ve DPPH (mg TE/100g km) değerlerinde meydana gelen değişimler

Deney No <sup>a</sup>	Voltaj Gradyanı (V/cm)	Süre (dk)	Verim	Toplam Fenolik Madde	DPPH
1	17.38	8.7	34.89	8451.72	164.31
2	14.06	1.0	34.71	9083.87	164.82
3	9.38	5.5	36.89	11442.33	232.44
4	14.06	5.5	36.02	10979.86	190.70
5	14.06	5.5	36.19	11073.85	191.17
6	14.06	10.0	33.22	9261.57	184.41
7	10.75	2.3	36.49	9629.79	179.15
8	14.06	5.5	36.46	11211.74	193.90
9	14.06	5.5	36.06	11051.87	191.94
10	17.38	2.3	34.65	9919.85	194.98
11	14.06	5.5	36.22	11290.47	191.49
12	10.75	8.7	34.08	10904.61	239.92
13	18.75	5.5	35.83	9746.75	190.70

<sup>a</sup> Rastgele seçilmiş

Çizelge 4. 2 incelendiğinde Fuerte çeşidi avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon modellemesi ile elde edilen ekstrakt verimlerinin (%) 33.22 ile 36.89 aralığında olduğu saptanmıştır. En yüksek ekstrakt veriminin 9.38 V/cm voltaj değeri ve 5.5 dk sürenin uygulandığı ekstraktlarda, en düşük verimin ise 14.06 V/cm voltaj değeri ve 10 dakika sürenin uygulandığı ekstraktlarda tespit edilmiştir.

Geleneksel yöntem ile karşılaştırmak için 95°C ve 120dk süre ile manyetik karıştırma ile yapılan sıcak maserasyon şartlarında avokado yaprağı fenolik su

ekstraktının ekstrakt verimi (%) ise 23.38 olarak bulunmuştur. Ayrıca yapılan bir çalışmada geleneksel ekstraksiyon yönteminde su, etanol ve metanol çözümlerini kullanarak ekstrakt verimini (%) sırasıyla 20.9, 16.8 ve 18.6 olduğunu bildirmişlerdir (Kamagate vd., 2016). Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen %36.89 ekstrakt veriminin geleneksel yöntemle elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.3. Avokado yaprağı ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstrakt verimi (%), TFM (mg GAE/100g km) ve DPPH (mg TE/100g km) değerlerinde meydana gelen değişimlere ait model katsayılar değerlendirme parametreleri

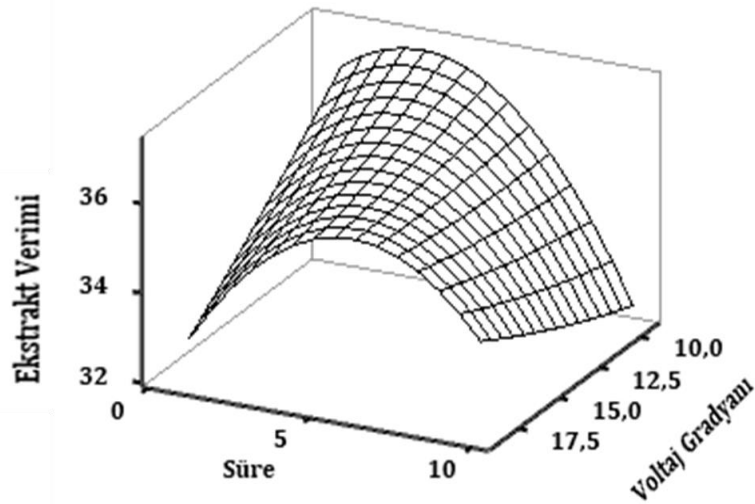
Model Katsayıları	Verim	TFM	DPPH
$\beta_0$	36.19	11121.6	191.842
$\beta_1$ (Voltaj Gradyanı)	-0.4464	-806.2	-21.001
$\beta_2$ (Süre)	-0.7554	10.3	10.220
$\beta_{11}$	0.102	-606	20.475
$\beta_{22}$	-2.293	-2027	-16.478
B12	1.323	-1371	-45.72
Model	***	***	***
Regresyon katsayısı ( $R^2$ )	98.72	98.79	99.80
Düzeltilmiş $R^2$ (Adj- $R^2$ )	97.80	97.93	99.65
Tahmin edilen $R^2$ (Pred- $R^2$ )	95.49	94.36	99.17
Uyum eksikliği (Lack of fit)	0.586	0.305	0.433

$\beta_0$  sabit katsayı,  $\beta_i$  birinci dereceden (doğrusal) denklem katsayısı,  $\beta_{ii}$  ikinci dereceden denklem katsayısı ve  $\beta_{ij}$  iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısıdır. <sup>ns</sup>, İstatistiksel olarak önemsiz ( $p \geq 0.05$ ); \*\*, İstatistiksel olarak % 99 seviyesinde önemli ( $p \leq 0.01$ ); \*\*\*, İstatistiksel olarak % 99.9 seviyesinde önemli ( $p \leq 0.001$ ).

Çizelge 4.3'te yanıt yüzey metoduna göre elde edilen modelde bağımsız değişkenlerden voltaj gradyanı ve sürenin birinci dereceden teriminin ekstrakt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak %99.9 seviyesinde önemli ( $p \leq 0.001$ ). Model içindeki ikinci dereceden değişkenlerinden voltaj değeri istatistiksel olarak önemsiz ( $p \geq 0.05$ ), süre ise istatistiksel olarak önemlidir ( $p \leq 0.001$ ). Voltaj ve süre etkileşimlerinin ekstrakt verimi (%) üzerine etkisi incelendiğinde ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ve ekstrakt verimi bakımından modelin tahmin gücünün yüksek olduğu görülmektedir ( $p \leq 0.001$ ). Lack of fit (uyum eksikliği) değerinin önemsiz ( $p \geq 0.05$ ) olması modelin hatasız

olduğunu göstermektedir. Deneme desenindeki voltaj ve süre parametrelerine bağlı olarak gerçekleşen ekstrakt verim (%) değişimlerini model %97.80 oranında açıklamaktadır ve ekstrakt verimi bakımından modelin tahmin gücünün yüksek olduğu görülmektedir.

Fuerte çeşidi avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon verimlerinin (%); bağımsız değişkenlerinden voltaj gradyanı ve sürenin etkisine bağlı değişimi Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde düşük voltaj değerinde sürenin artışıyla birlikte ekstrakt veriminde önce artış sonra belirli bir noktadan sonra azalış olurken, yüksek voltaj değerinde sürenin artışıyla birlikte önce artış belirli bir süreden sonra ise kısmi bir azalış olduğu tespit edilmiştir. Düşük sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte ekstrakt verimi azalırken, yüksek sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte arttığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada yacon yapraklarında ohmik ısıtma ve geleneksel yöntem karşılaştırıldığında ohmik ısıtma sisteminin kısa işlem süresi ile ekstrakt verimi bakımından önemli bir parametre olduğunu ve daha hızlı ısı üretim ile geleneksel yöntemden daha iyi olduğu bildirilmiştir (Khajehei vd., 2017).



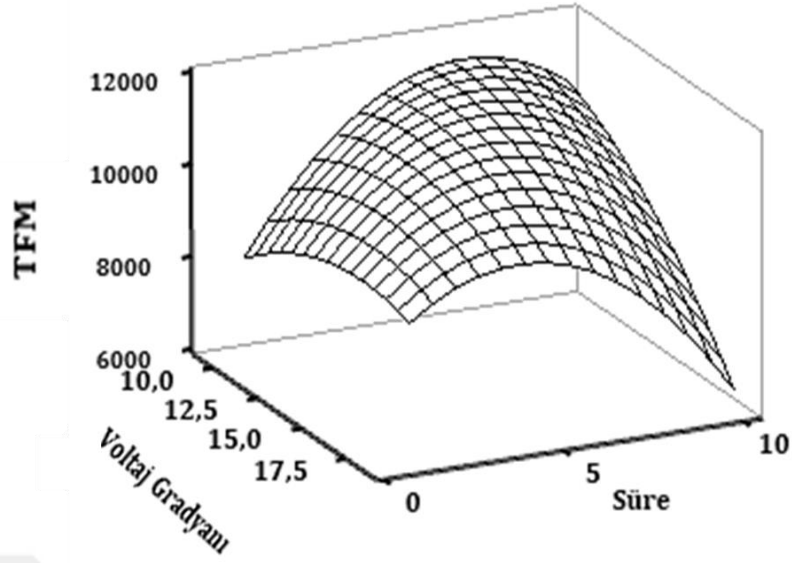
Şekil 4.1. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstrakt verimi değerinde, ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden voltaj ve sürenin etkisine bağlı değişimi

Literatür taramalarında avokado yapraklarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir RSM ile ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon modelleme çalışmasına rastlanılmamıştır.

Fuerte çeşidi avokado yapraklarının TFM sonuçları incelendiğinde değerlerin 8451.72 ile 11442.33 mg GAE/100g km aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek fenolik madde miktarı ise 9.38 V/cm voltaj değeri ve 5.5 dk süre kullanılarak yapılan ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik madde miktarı ise 17.38 V/cm voltaj değeri ve 8.7 dk süre kullanılarak yapılan ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. Kontrol olarak kullandığımız geleneksel yöntemlerden 95°C ve 2 saat süre ile manyetik karıştırma ile yapılan sıcak maserasyon şartlarında avokado yaprağı fenolik su ekstraktının TFM miktarı (mg GAE/100g km) ise 9889.97 olarak bulunmuştur. Ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen 11442.33 mg GAE/100g km toplam fenolik madde miktarının geleneksel yöntemle elde edilen sonuçtan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon süresinin 5.5 dakika olması, maserasyonda ise 120 dakika olduğu göz önüne alındığında, 20.5 kat daha az sürede ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesinin hem zaman hem de enerji tasarrufu bakımından ohmik ısıtmayı ön plana çıkardığı görülmektedir. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen 11442.33 mg GAE/100g km toplam fenolik madde miktarının literatürde karşılaştırılabileceği bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat farklı çözücü ve ekstraksiyon metotları kullanılarak yapılan diğer avokado yaprakları ekstraksiyon çalışmalarında ise toplam fenolik madde miktarları 3.41 mg/100g (Arukwe vd., 2012), 92.85 mg GAE/g (Obboh et al., 2016), 2707.3 ± 155.4 µg GAE/g, 2952.7 ± 166.0 µg GAE/g ve 1873.1 ± 63.5 µg GAE/g (Kamagate vd., 2016), 23.710 mg GAE/100 g km (Yamassaki vd., 2017), 48.732 mg GAE/100 g km (Che-Galicia vd., 2020), 352.3 mg/100g (Murathan ve Kaya, 2020) tespit edilmiş olup, literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında kuru madde bakımından ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyonu ile elde edilen sonucun daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durumun kullanılan avokado çeşidi, ekstraksiyon yöntemi ve çözücü farklılığı vb. faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.3'te avokado yapraklarının TFM miktarları için geliştirilmiş, ekstraksiyon parametrelerine bağlı değişimi ifade eden model incelendiğinde; voltaj gradyanı değerinin birinci dereceden terimleri istatistiksel olarak %99.9 seviyesinde önemli bulunurken ( $p \leq 0.001$ ), süreye bağlı olan birinci dereceden terimin TFM üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ( $p \geq 0.05$ ). Model içindeki ikinci dereceden değişkenlerinden voltaj gradyanı ve süre değerleri istatistiksel olarak önemli. Voltaj gradyanı ve süre etkileşimlerinin TFM üzerine etkisi incelendiğinde ise istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ve TFM bakımından modelin tahmin gücünün yüksek olduğu görülmektedir ( $p \leq 0.001$ ). Lack of fit (uyum eksikliği) değerinin önemsiz ( $p \geq 0.05$ ) olması modelin hatasız olduğunu göstermektedir. Elde edilen modelin, TFM değerinde voltaj gradyanı ve sürenin ekstraksiyon parametrelerine bağlı gerçekleşen değişimleri %97.93 oranında açıkladığı belirlenmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı üzerine ekstraksiyon parametreleri olan bağımsız değişkenlerden voltaj gradyanı ve sürenin etkisine bağlı değişimi Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.2 incelendiğinde düşük sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte TFM miktarında önce artış belirli bir noktadan sonra kısmi bir azalış olurken, yüksek sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte azalış olduğu tespit edilmiştir. Düşük voltaj değerinde sürenin artışıyla birlikte TFM miktarında önce artış belirli bir noktadan sonra kısmi bir azalış olurken, yüksek voltaj değerlerinde sürenin artışıyla birlikte önce artış belirli bir noktadan sonra azalış olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada asma yapraklarında ohmik ısıtmanın termal etkisine ek olarak ekstraksiyon işlemi sırasında uygulanan ılımlı elektrik alanı hücre zarlarının elektroporasyonunu artırması nedeniyle ani bir polifenolik bileşik salınımını indüklemeye potansiyeline sahip olduğunu ve böylece enerji ve işlem süresinin azaldığı bildirilmiştir (Jesus vd., 2020). Aynı şekilde zeytin yapraklarında yapılan bir çalışmada ise ohmik ısıtmanın içeriden dışarıya ısı üretimi kullanarak, geleneksel ısıtma yöntemlerinin doğasında bulunan olumsuzlukların üstesinden gelerek TFM ve ekstrakt verimi üzerinde oldukça etkili bir sistem olduğu bildirilmiştir (Markhali vd., 2022).



Şekil 4.2. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraktının toplam fenolik madde (TFM) miktarının ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden voltaj ve sürenin etkisine bağlı değişimi

Literatür taramaları sonucunda avokado yaprakları kullanılarak voltaj ve sürenin toplam fenolik madde üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir RSM ile ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon modelleme çalışmasına rastlanılmamıştır.

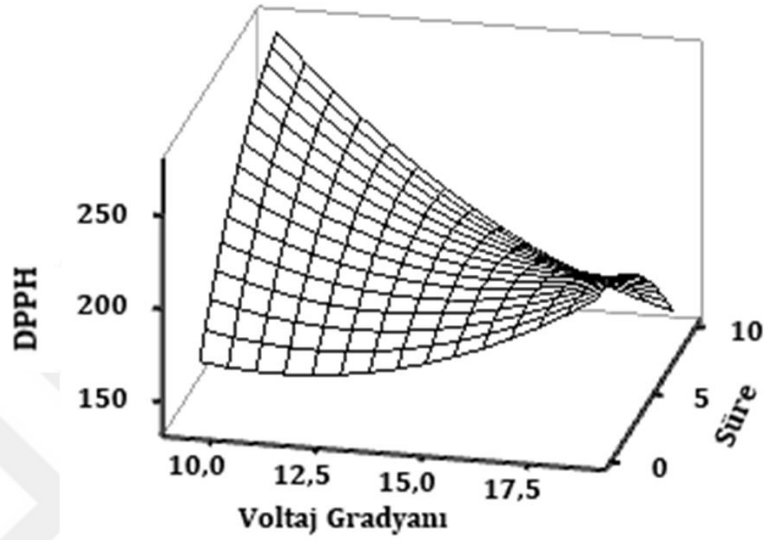
Fuerte çeşidi avokado yapraklarının DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite sonuçları incelendiğinde değerlerin 164.31 ile 239.92 mg TE/100g km arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değeri ise 10.75 V/cm voltaj değeri ve 8.7 dk süre kullanılarak yapılan ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. En düşük DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değeri ise 17.38 V/cm voltaj değeri ve 8.7 dk kullanılarak yapılan ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. Sabit süre ve sıcaklık değerlerinde voltaj değerinin artması sonucu serbest radikalleri yakalama aktivitesinde düşüş yaşandığı gözlemlenmiştir. Kontrol olarak kullandığımız geleneksel yöntemlerden 95°C ve 2 saat süre ile manyetik karıştırma ile yapılan sıcak maserasyon şartlarında avokado yaprağı fenolik su ekstraktının DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değeri ise 344.24 olarak bulunmuştur. Ohmik

ısıtma destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen 239.92 mg TE/100g km DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerinin geleneksel yöntemle elde edilen sonuçtan daha düşük olduğu tespit edilmiş olup geleneksel yöntem ile ohmik ısıtmanın etkisi karşılaştırıldığında voltajın antioksidan aktivite üzerinde önemli bir etkisi olduğu sonucuna varılabilmektedir. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen 239.92 mg TE/100g km DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerinin literatürde karşılaştırılabileceği bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat farklı çözücü ve ekstraksiyon metotları kullanılarak yapılan diğer avokado yaprakları ekstraksiyon çalışmalarında ise DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değeri 25.21 mg/mL (Obob vd., 2016), 32.60-32.73 µg/mL (Kumar ve Cumbal, 2016), 72.61 mg/L (Rahman ve Dewi, 2018), 271.86 µg/L (Castro-López vd., 2019) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3'te avokado yapraklarının DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerleri için geliştirilmiş, ekstraksiyon parametrelerine bağlı değişimi ifade eden model incelendiğinde; voltaj gradyanı değerinin birinci dereceden terimleeri istatistiksel olarak %99.9 seviyesinde önemli bulunurken ( $p \leq 0.001$ ), süreye bağlı olan birinci dereceden teriminin DPPH üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ( $p \geq 0.05$ ). Model içindeki ikinci dereceden değişkenlerinden voltaj değeri istatistiksel olarak önemsiz, süre ise istatistiksel olarak önemlidir. Voltaj gradyanı ve süre etkileşimlerinin DPPH üzerine etkisi incelendiğinde ise istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ve DPPH bakımından modelin tahmin gücünün yüksek olduğu görülmektedir ( $p \leq 0.001$ ). Lack of fit (uyum eksikliği) değerinin önemsiz ( $p \geq 0.05$ ) olması modelin hatasız olduğunu göstermektedir. Elde edilen modelin, DPPH değerinde voltaj ve sürenin ekstraksiyon parametrelerine bağlı gerçekleşen değişimleri %99.65 oranında açıkladığı belirlenmiştir.

Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon modellemesinde yanıt olarak belirlenen DPPH miktarının; bağımsız değişkenlerden voltaj gradyanı ve sürenin etkisine bağlı değişimi Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.3 incelendiğinde düşük sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte DPPH

miktarında artış olurken, yüksek sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte azalış olduğu tespit edilmiştir. Düşük voltaj değerlerinde sürenin artışıyla birlikte DPPH miktarında azalış olurken, yüksek voltaj değerlerinde sürenin artışıyla birlikte önce artış belirli bir noktadan sonra azalış olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. Avokado yapraklarının ohmik ısıtma destekli su ekstraktının DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerinin ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden voltaj ve sürenin etkisine bağlı değişimi

Literatür taramaları sonucunda avokado yaprakları kullanılarak voltaj ve sürenin DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir RSM ile ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon modelleme çalışmasına rastlanılmamıştır.

#### 4.3. Avokado Yaprak Ekstraktlarının Verim, Toplam Fenolik Madde ve DPPH Miktarlarının Optimizasyonu ve Modelin Doğrulanması

Merkezi karma deney tasarımı kullanılarak avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların verimi (%), TFM miktarları (mg GAE/100g km) ve DPPH (mg TE/100g km) yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri maksimize edilerek elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları sırasıyla voltaj gradyanı ve süre için 9.38 V/cm

ve 6 dk olarak belirlenmiştir. Model tarafından optimum ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon koşullarında avokado yapraklarından ekstrakt verimi %35.99-36.97, ekstraktın toplam fenolik madde miktarı 11015-11886 mg GAE/100g km ve DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri ise 232.47-243.19 mg TE/100g km aralığında tahmin edilmiştir.

Modelin tahmin değerini deneysel olarak doğrulamak amacıyla, optimum koşullarda (Voltaj gradyanı: 9.38 V/cm; alternatif akım; süre: 6 dk; sıcaklık: 95°C; katı/çözücü oranı: 5 g kuru yaprak/500 mL %0.15 NaCl-su) avokado yaprağı örneklerinden tekrar ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir, elde edilen ekstraktlarda verim, toplam fenolik madde ve DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Ekstraksiyon verimi %36.86, TFM miktarı 11770.81 mg GAE/100g km ve DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değeri ise 233.27 mg TE/100g km olarak tespit edilmiştir. Bu değerler yukarıda verilen model tahmin aralıkları içerisinde yer almıştır. Bu sonuçlara göre elde edilen modeller doğrulanmıştır.

#### **4.4. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Avokado Yaprağı Su Ekstraktının Enkapsülasyonu ve Bazı Fizikokimyasal Özellikleri**

Optimum ekstraksiyon koşullarında avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyonu yapılarak elde edilen sulu ekstrakt, farklı miktarlarda  $\alpha$ -siklodekstrin ( $\alpha$ -SD) ile homojenize edilip, vakumlu kurutucu vasıtasıyla kurutma işlemi uygulanmasının ardından toz hale getirilerek üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). Kuru ekstrakt miktarı bilinen (0,43g/100mL) örnekten enkapsülasyon işlemi için  $\alpha$ -siklodekstrin (g/10mL ekstrakt) miktarı 2.43 ( $\alpha$ -SD1), 4.86 ( $\alpha$ -SD2), 7.29 ( $\alpha$ -SD3) ve 9.72 ( $\alpha$ -SD4) olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktın  $\alpha$ -siklodekstrin ile inklüzyon kompleksi oluşturma prensibine dayanarak toz kapsül üretimi deneme deseni ile kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği (%), su aktivitesi ( $a_w$ ) ve nem içeriği (%) sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Avokado yaprağı optimum ekstraktından enkapsülasyon işlemi deneme deseni sonuçları

Deney No	Bağımsız değişken		Bağımlı değişkenler		
	Kuru Ekstrakt (g/100mL)	$\alpha$ -Siklodekstrin Miktarı (g/10mL ekstrakt)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Su Aktivitesi ( $a_w$ )	Nem İçeriği (%)
$\alpha$ -SD1	0.43	2.43	35.19	0.294	12.38
$\alpha$ -SD2	0.43	4.86	44.83	0.269	11.11
$\alpha$ -SD3	0.43	7.29	44.86	0.265	11.05
$\alpha$ -SD4	0.43	9.72	47.13	0.253	10.52

Elde edilen kapsüllerden % enkapsülasyon etkinliği sonuçlarına göre  $\alpha$ -siklodekstrin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak su aktivitesi değerinde ve % nem miktarında düşüş yaşanmıştır. Deneme deseninden elde edilen sonuçlara göre en yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) sonucunu veren kapsülde ( $\alpha$ -SD4) %47.13 bulunmuştur. Enkapsülasyon işlemi sonucu toplamda 7.29 g toz kapsül elde edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında, avokado yaprağı ekstraktlarından inklüzyon kompleksi ile yapılmış bir enkapsülasyon çalışmasına rastlanmamıştır.



Şekil 4.4. Avokado yaprağı fenolik ekstraktından üretilen toz kapsüller

Aynı zamanda avokado yapraklarından optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ohmik ısıtma destekli su ekstraktın ve ekstraktan  $\alpha$ -siklodekstrin

inklüzyon kompleksi ile üretilen kapsüllerin toplam fenolik madde miktarı, fenolik bileşimi, serbest radikalleri yakalama aktiviteleri tespit edilmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile avokado yaprağı ohmik ısıtma destekli su ekstraktının ve ekstraktan  $\alpha$ -siklodekstrin inklüzyon kompleksi ile üretilen kapsüllerin fenolik bileşenlerine ilişkin değerler Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Ekstrakt ve kapsüllerin fenolik bileşenleri (mg/100g km)

Fenolik Bileşenler	Ekstrakt	Kapsül ( $\alpha$ -SD4)
<i>p</i> -Hidroksi benzoik asit	37.15 $\pm$ 0.01	2.90 $\pm$ 0.03
Klorojenik asit	819.04 $\pm$ 0.01	73.34 $\pm$ 0.02
Sinamik asit	11.74 $\pm$ 0.02	*
Rutin	533.40 $\pm$ 0.03	47.24 $\pm$ 0.01
Protokateşik asit	285.90 $\pm$ 0.00	*
Kateşin	1086.19 $\pm$ 0.05	*
Benzoik asit	*	58.18 $\pm$ 0.02
Epikateşin	*	68.84 $\pm$ 0.01

\*: Tespit edilemedi.

Çizelge 4.5 incelendiğinde avokado yaprakları optimum su ekstraktının fenolik bileşenlerinin büyük bir çoğunluğunun kateşinden (1086.19 mg/100g km) meydana geldiği bulunmuştur. Ayrıca onu sırasıyla klorojenik asit, rutin, protokateşik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve sinamik asit içerdiği tespit edilmiştir. Ancak benzoik asit, epikateşin, luteolin, *p*-kumarik asit, vanilin, gallik asit, şirincik asit, kafeik asit, ferulik asit bileşenleri tespit edilememiştir. Kapsüllerde ise fenolik bileşenlerden en fazla klorojenik asit (73.34 mg/100g km) bulunmaktadır. Bu bileşeni sırasıyla epikateşin, benzoik asit, rutin ve *p*-hidroksi benzoik asit takip etmiştir. Avokado yaprak ekstraktından inklüzyon kompleksi ile elde edilen toz kapsüllerde sinamik asit, protokateşik asit ve kateşin fenolik bileşenleri ise kapsülleme sonrasında dedeksiyon limitinin altında kaldığı için kapsüllerde tespit edilememiştir. Fakat kapsüllerde optimum ekstraktan farklı olarak fenolik bileşenlerin türevi olan benzoik asit ve epikateşin tespit edilmiştir. Bunun sebebi kapsüllerin çözündürüldüğü çözeltiliye ultrases dalgalarının verilmesi sonucu kapsüle hapsedilen ekstrakta bulunan fenolikleri ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Araştırma bulguları yapılan

literatür taramaları ile karşılaştırıldığında; avokado yapraklarında ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile fenolik bileşen içeriğinin tespit edildiği çalışmada benzer şekilde ultrases dalgalarının fenolik bileşen içeriğini arttırdığı bildirilmiştir (Castro-Lopez vd., 2019; Che-Galicia vd., 2020).

Literatür taramalarında Polat Köse vd. (2020) kurutulmuş avokado (*Folium perseae*) yapraklarının liyofilize su ekstraktlarında ve etanol ekstraktlarında fenolik bileşik (mg/kg) içeriğini sırasıyla kafeik asit için 10.83-32.74, klorojenik asit için 28.83-852.81, rutin için 26.05-68.41 verilen değerleri HPLC-MS sistemi ile tespit etmiştir. Isaac vd. (2014) tarafından avokado yaprak su ekstraktlarında fenolik bileşik (mg/100g) içeriğini şirincik asit 31.65, *p*-hidroksibenzoik asit 2.51, ferulik asit 7.09, epikateşin 2.84 fenolik bileşik içerdiği (mg/100g) bildirilmiştir. Oboh vd. (2014) tarafından 1M HCl ve metanol avokado yaprak ekstraktlarındaki fenolik bileşikler (mg/100g) şirincik asit 31.65, *p*-hidroksibenzoik asit 2.51, ferulik asit 7.09, epikateşin 2.84 değerleri gaz kromatografisi sistemi kullanılarak bildirilmiştir. Araştırma bulguları yapılan literatür taramaları ile karşılaştırıldığında; avokado yaprak ekstraktlarında bulunan fenolik bileşen miktarlarının benzer aralıklarda olduğu görülmektedir. Farklılıkların ise kullanılan avokado çeşidi, çözücü ve ekstraksiyon yöntemi farklılığı, iklim şartları, hasat zamanı vb. faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.6. Ekstrakt ve kapsüllerin fonksiyonel özellikleri

Fonksiyonel Özellikler	Ekstrakt	Kapsül ( $\alpha$ -SD4)
TFM (mg GAE/g ekstrakt)	315.79 $\pm$ 5.29	148.81 $\pm$ 0.82
DPPH (mg TE/g ekstrakt)	6.34 $\pm$ 1.15	0.88 $\pm$ 0.55

TFM: Toplam Fenolik Madde; DPPH: Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi

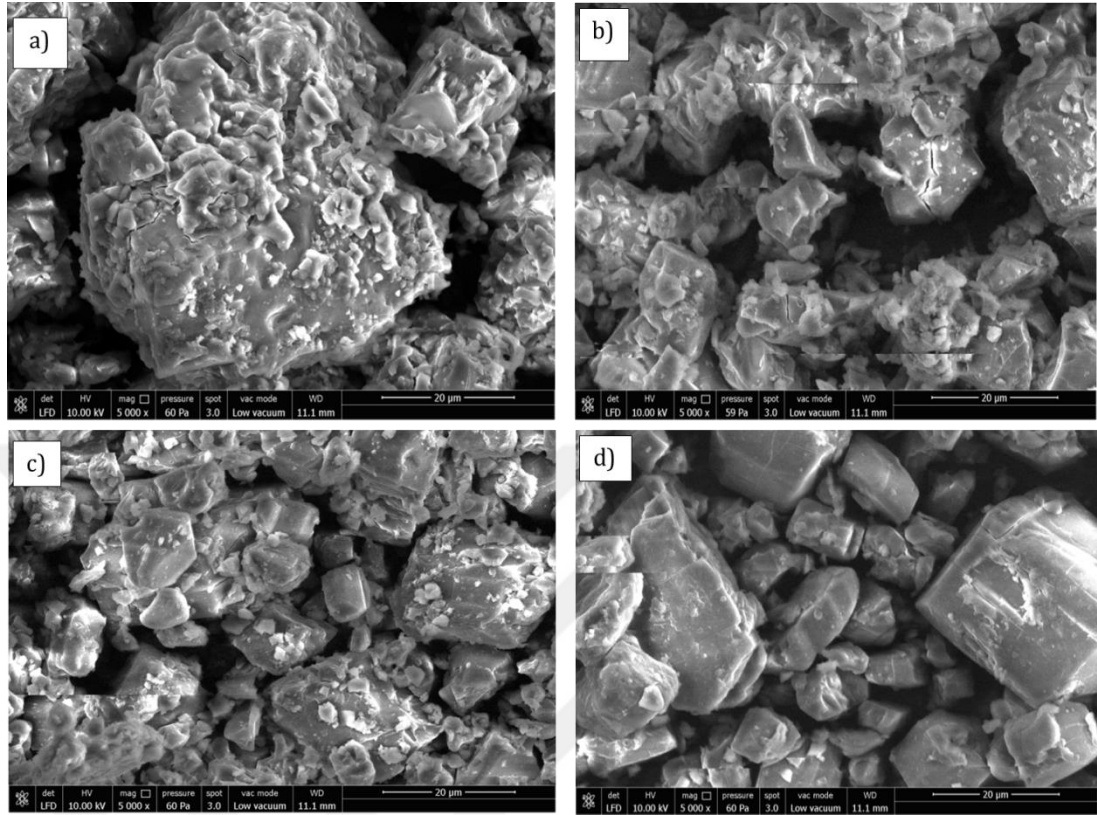
Avokado yapraklarından optimum koşullarda elde edilen su ekstraktlarının ve enkapsüle edilen toz kapsüllerin ( $\alpha$ -SD4) fonksiyonel özelliklerine ilişkin değerler Çizelge 4.6'de verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı avokado yapraklarının su ekstraktında 315.79  $\pm$  5.29 mg GAE/g ekstrakt, ekstraktan inklüzyon sistemi ile üretilen kapsüllerde ise 148.81  $\pm$  0.82 mg GAE/100g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Kapsüller, avokado yaprak su ekstraktlarının

neredeysi yarısı kadar TFM miktarı içermektedir. Yani fenoliklerin büyük kısmı kapsüllerin içerisine alınmıştır. Çizelgeye göre, DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi miktarı avokado yaprak ekstraktlarında  $6.34 \pm 1.15$  mg TE/100g ekstrakt, kapsüllerde ise  $0.88 \pm 0.55$  mg TE/100g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Literatür taramalarında avokado yaprak su ekstraktından inklüzyon sistemi ile üretilen kapsül çalışmasına rastlanılmamıştır. Kapsüllerin serbest radikal yakalama aktivitesi, optimum koşullarda ekstrakte edilen avokado yaprak su ekstraktlarından daha düşük olduğu bulunmuştur. Bunun sebebi ise ekstrakta uygulanan enkapsülasyon işleminde uygulanan proses (homojenizasyon, kurutma, ekstraksiyon) esnasında kayıp yaşandığı düşünülmektedir. Ekstraktın ve kapsüllerin içerdiği TFM miktarı ile DPPH radikalleri yakalama aktivite değerlerinin doğru orantılı olduğu bulunmuştur.

Literatür taramalarında Oboh vd. (2016) avokado yapraklarının su ekstraktı DPPH radikalleri yakalama aktivite değerlerinin 25.21 mg/mL olarak bildirmiştir. Kumar ve Cumbal (2016) tarafından yapılan çalışmada ise yaprak su ekstraktlarının gallik asit eşdeğerine (GAE) göre DPPH radikal yakalama aktivitesi 32.60-32.73 µg/mL (% 84.46-80.12) olduğu bildirilmiştir. Rahman vd. (2018) tarafından avokado yapraklarının %96'lık etanol ekstraktlarında serbest radikalleri yakalama aktivite değerleri spektrofotometrik yöntemle elde ettikleri % inhibisyon (IC<sub>50</sub>) değeri 72.61 mg/L olarak bildirilmiştir. Castro-Lopez vd. (2019) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise ultrason ile ekstrakte edilen Platano Delgado çeşidi avokado yapraklarının serbest radikalleri yakalama aktivitesinin 271.86 µg/mL IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Polat Köse vd. (2020) ise avokado yaprağı liyofilize su ve etanol ekstraktında DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi için sırası ile IC<sub>50</sub> değerleri 240.40 ve 601.00 µg/mL olarak bildirilmiştir. Sonuçlardaki farklılıkların sebebi olarak ekstraksiyonda kullanılan farklı çözümler ve metotlar ile çeşit farklılığı gibi faktörler gösterilebilir.

Elde edilen sonuçlara göre farklı oranlarda kaplama materyali kullanılan kapsüllerde farklı boyutlarda ve yüzey özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı oranlarda α-Siklodekstrin (2.43, 4.86, 7.29, 9.72g) kullanılarak fenolik

ekstraktından (g/10mL) üretilen kapsüllere ( $\alpha$ -SD1,  $\alpha$ -SD2,  $\alpha$ -SD3,  $\alpha$ -SD4) ait SEM görüntüleri (5000x büyütme) Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5.  $\alpha$ -Siklodekstrin-fenolik ekstraktından üretilen kapsüllere ait SEM görüntüleri; a)  $\alpha$ -SD1 b)  $\alpha$ -SD2 c)  $\alpha$ -SD3 d)  $\alpha$ -SD4.

Şekil 4.5 a, b ve c' nin düzensiz şekilli kristal yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Bu kristal yapı daha önce yapılan çalışmalarda polifenol bileşiklerin iğne benzeri düzensiz kristal bir yapı oluşturduğu bildirilmiştir (Pralhad ve Rajendrakumar, 2004; Li vd., 2019). Şekil 4.5 d'nin ise eşkenar dörtgen bir yapı göstermiştir. Enkapsülasyon etkinliğinde (%) en yüksek yükleme kapasitesi gösteren kapsüllerin diğer örneklerden farklı bir morfolojik yapı gösterdiği gözlemlenmiştir. Polifenollerin  $\alpha$ -siklodekstrin içine dahil edilmesi üzerine, konuk moleküllerin kristallikteki bir kayıp nedeniyle inklüzyon kompleksinin yüzeyinin büyük ölçüde değiştiği literatürde bildirilmiştir (Li vd., 2019). Literatür taramaları sonucunda avokado yapraklarının enkapsüle edilip morfolojisinin incelendiği herhangi çalışmaya rastlanılmamıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Avokado ağacının yapraklarından fenolik bileşenlerce zengin ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyonu için deney parametreleri optimize edilmiş ve belirlenen şartlarda elde edilen ekstraktan inklüzyon kompleksi oluşturulan toz kapsül üretilmiştir. Enkapsülasyon öncesi elde edilen optimum ekstraktlarda ile enkapsülasyon sonrası toz kapsüllerin fizikokimyasal özelliklerinin, biyoaktif bileşenlerinin ve biyofonksiyonel özelliklerinin (antioksidan) belirlenmesinin amaçlandığı bu tez çalışmasında elde edilen bulgular aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Çalışmada ilk olarak, kurutulmuş avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon deneme deseni merkezi karma deney tasarımı metodu ve deney parametrenin optimizasyonu ise yanıt yüzey metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Avokado yapraklarından ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların ekstrakt verimi (%), toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/100g km) ve DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi (mg TE/100g km) maksimize edilerek elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları sırasıyla voltaj ve süre için 9.38 V/cm ve 6 dk olarak bulunmuştur. Ekstrakt verimi, düşük voltaj değerinde sürenin artışıyla birlikte ekstrakt veriminde önce artış sonra belirli bir noktadan sonra azalış olurken, yüksek voltaj değerinde sürenin artışıyla birlikte önce artış belirli bir süreden sonra ise kısmi bir azalış olduğu tespit edilmiştir. Düşük sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte ekstrakt verimi azalırken, yüksek sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte arttığı belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarında, düşük sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte toplam fenolik madde miktarında önce artış belirli bir noktadan sonra kısmi bir azalış olurken, yüksek sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte azalış olduğu tespit edilmiştir. Düşük voltaj değerinde sürenin artışıyla birlikte toplam fenolik madde miktarında önce artış belirli bir noktadan sonra kısmi bir azalış olurken, yüksek voltaj değerlerinde sürenin artışıyla birlikte önce artış belirli bir noktadan sonra azalış olduğu belirlenmiştir. DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerinde ise düşük sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte DPPH

miktarında artış olurken, yüksek sürelerde voltaj değerinin artışıyla birlikte azalış olduğu tespit edilmiştir. Düşük voltaj değerlerinde sürenin artışıyla birlikte DPPH miktarında azalış olurken, yüksek voltaj değerlerinde sürenin artışıyla birlikte önce artış belirli bir noktadan sonra azalış olduğu saptanmıştır.

Ohmik ısıtma destekli su ekstraksiyonu için uygulanan metotun doğrulaması yapılarak teorik ve deneysel veriler karşılaştırıldığında deneysel olarak elde edilen verilerin model tarafından öngörülen tahmin aralığında olduğu tespit edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktın ekstrakt verimi % 36.86, toplam fenolik madde miktarı 11770.81 mg GAE/100g km ve DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi 233.27 mg TE/100g km olarak bulunmuştur. Optimum ekstrakta en fazla bulunan fenolik bileşenlerin kateşin, klorojenik asit, rutin ve protokateşik asit olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise avokado yaprağı fenolik ekstraktından üretilen  $\alpha$ -siklodekstrin ile inklüzyon kompleksi oluşturma işlemi için 4 farklı miktarda (2.43, 4.86, 7.29, 9.72 g/10mL ekstrakt)  $\alpha$ -siklodekstrin kullanılmıştır. Deneme sonuçlarına göre 9.72 g/10mL ekstrakt konsantrasyondaki örnekte enkapsülasyon etkinliği % 47,13 olarak tespit edilmiştir.

Son olarak, avokado yapraklarından optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ohmik ısıtma destekli su ekstraktının ve ekstraktan üretilen toz kapsüllerin, TFM içeriği sırasıyla 315.79 ve 148.81 mg GAE/g ekstrakt ve DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değeri ise sırasıyla 6.34 ve 0.88 mg TE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar kapsamında en fazla ağaca sahip olan Fuerte avokado çeşidinin budanma döneminde elde edilecek olan yaprakların değerlendirilerek katma değeri yüksek fonksiyonel ürünlere dönüştürülebilecektir. Optimum şartlarda elde edilen ekstrakt ve toz kapsüllerin literatürde belirtilen sağlığı teşvik edici etkisi sebebiyle bitkisel gıda takviyesi ve/veya gazlı içecek, meşrubat, çay vb. fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adeboye, J. O., Fajonyomi, M. O., Makinde, J. M., & Taiwo, O. B. (1999). A Preliminary Study on the Hypotensive Activity of *Persea americana* Leaf Extracts in Anaesthetized Normotensive Rats. *Fitoterapia*, 70(1), 15–20.
- Adeyemi, O. O., Okpo, S. O., & Ogunti, O. O. (2002). Analgesic and Anti-inflammatory Effects of the Aqueous Extract of Leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *Fitoterapia*, 73(5), 375–380.
- Ant, A., Avcı, A., Genç, M., İnal, E., Tunçel, Ü., & Şencan, Z. (2017). Avokado Yaprağı Ekstresinin Larinks Kanseri Dokularında Adenozin Deaminaz (ADA) Üzerine Aktive Edici Etkisi. *Acta Oncologica Turcica*, 51(2), 199–204.
- Arukwe, U., Amadi, B. A., Duru, M. K. C., Agomou, E. N., Adindu, E. A., Odika, P. C., Lele, K. C., Egejuru, L., & Anudike, J. (2012). Chemical Composition of *Persea americana* Leaf, Fruit and Seed. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 11(2), 346–349.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A Review on the Use of Cyclodextrins in Foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631–1640.
- Avcı, A., & Dönmez, S. (2010). Siklodekstrinler ve Gıda Endüstrisinde Kullanımları. *Gıda*, 35(4), 305–312.
- Bayram, S. (2010). Avokado (*Persea americana* Mill.). 2010 Yılı Avokado Gelişim Raporu. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 39.
- Bayram, S., & Aşkın, M. A. (2006). Bazı Avokado Çeşitlerinde Hasat Zamanının Belirlenmesinde Yağ ve Kuru Ağırlık Parametrelerinin Kullanımı. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1(2), 38-48.
- Brai, B. I. C., Adisa, R. A., & Odetola, A. A. (2014). Hepatoprotective Properties of Aqueous Leaf Extract of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) “Avocado” Against CCL4-Induced Damage in Rats. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 11(2), 237–244.
- Brai, B. I. C., Odetola, A. A., & Agomo, P. U. (2007). Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Potential of *Persea americana* Leaf Extracts. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 356–360.
- Brovelli, E. A., Vallejos, J. A., Ikonte, C., Menon, G. R., Fast, D. J., & Amitabh, C. (2005). Compositions Containing Avocado Leaf Extract for Lowering Cholesterol Levels. U.S. Patent Application No. 10/855,301.
- Butt, A. J., Roberts, C. G., Seawright, A. A., Oelrichs, P. B., MacLeod, J. K., Liaw, T. Y. E., Kavallaris, M., Somers-Edgar, T. J., Lehrbach, G. M., Watts, C. K., &

- Sutherland, R. L. (2006). A Novel Plant Toxin, Persin, with In Vivo Activity in the Mammary Gland, Induces Bim-Dependent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(9), 2300–2309.
- Caponio, F., Alloggio, V., & Gomes, T. (1999). Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil: Influence of Paste Preparation Techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203–209.
- Castro-López, C., Bautista-Hernández, I., González-Hernández, M., Martínez-Ávila, G., Rojas, R., Gutiérrez-Díez, A., Medina-Herrera, N., & Aguirre-Arzola, V. (2019). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaf Purified Hydroalcoholic Extracts From Seven Mexican *Persea americana* Cultivars. *Molecules*, 24(1), 173.
- Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2015). Antioxidant Capacity of Quercetin and Its Glycosides in the Presence of  $\beta$ -Cyclodextrins: Influence of Glycosylation on Inclusion Complexation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 83(3), 309–319.
- Cetin Babaoglu, H., Bayrak, A., Ozdemir, N., & Ozgun, N. (2017). Encapsulation of Clove Essential Oil in Hydroxypropyl  $\beta$ -Cyclodextrin for Characterization, Controlled Release, and Antioxidant Activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), 1–8.
- Che-Galicia, G., Váquiro-Herrera, H. A., Sampieri, Á., & Corona-Jiménez, E. (2020). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds From Avocado Leaves (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*): Optimization and Modeling. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 18(7), 2192–2205.
- Chew, S. C., Tan, C. H., Pui, L. P., Chong, P. N., Gunasekaran, B., & Lin, N. K. (2019). Encapsulation Technologies: A Tool for Functional Foods Development. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 8(5), 154–160.
- Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J. C., Simal-Gandara, J., & Astray, G. (2022). Cyclodextrins Inclusion Complex: Preparation Methods, Analytical Techniques and Food Industry Applications. *Food Chemistry*, 384, 132467.
- Ciobanu, A., Landy, D., & Fourmentin, S. (2013). Complexation Efficiency of Cyclodextrins for Volatile Flavor Compounds. *Food Research International*, 53(1), 110–114.
- Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & Valdramidis, V. (2011). Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods. Academic Press (Chapter 11), 305-359.
- Da Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Rutz, J. K., da Luz, S. R., Krumreich, F.

- D., Benvenuti, E. V., & Nunes, M. R. (2014). Encapsulation of the Phenolic Compounds of the Blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 527–533.
- Dabas, D., Shegog, R., Ziegler, G., & Lambert, J. (2013). Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6133–6140.
- de Almeida, A. P., Miranda, M. M. F. S., Simoni, I. C., Wigg, M. D., Lagrota, M. H. C., & Costa, S. S. (1998). Flavonol Monoglycosides Isolated From the Antiviral Fractions of *Persea americana* (Lauraceae) Leaf Infusion. *Phytotherapy Research*, 12, 562–567.
- Demirkol, A. (2002). Bazı Avokado Çeşitlerinin Antalya Koşullarında Gösterdiği Fenolojik ve Pomolojik Özellikler ve Verim Durumları. *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 12(2), 49–64.
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a Tool for Bioprocessing of Functional Foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31–37.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the Antioxidant Properties of De-Odourised Aqueous Extracts From Selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83(2), 255–262.
- dos Santos Lima, B., Shanmugam, S., de Souza Siqueira Quintans, J., Quintans-Júnior, L. J., & de Souza Araújo, A. A. (2019). Inclusion Complex with Cyclodextrins Enhances the Bioavailability of Flavonoid Compounds: a Systematic Review. *Phytochemistry Reviews*, 18(5), 1337–1359.
- El Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. (2013). Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1281–1289.
- FAO (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture Database. <https://www.faostat.fao.org> (Son erişim tarihi: 07.07.2020)
- Fryer, P. J., de Alwis, A. A. P., Koury, E., Stapley, A. G. F., & Zhang, L. (1993). Ohmic Processing of Solid-Liquid Mixtures: Heat Generation and Convection Effects. *Journal of Food Engineering*, 18(2), 101–125.
- Gross, J., Gabai, M., Lifshitz, A., & Sklarz, B. (1973). Carotenoids in Pulp, Peel and Leaves of *Persea americana*. *Phytochemistry*, 12(9), 2259–2263.
- Gümüştpe, L., Aydın, E., & Özkan, G. (2022). Avokado Biyoaktif Bileşenleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 10(1), 341–359.

- Hădărugă, N. G., Hădărugă, D. I., Păunescu, V., Tatu, C., Ordodi, V. L., Bandur, G., & Lupea, A. X. (2006). Thermal Stability of the Linoleic Acid/ $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrin Complexes. *Food Chemistry*, 99(3), 500–508.
- Ho, S., Thoo, Y. Y., Young, D. J., & Siow, L. F. (2017). Inclusion Complexation of Catechin by  $\beta$ -Cyclodextrins: Characterization and Storage Stability. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 555–565.
- Isaac, A., Ganiyu, O., Akinyemi, A. J., Agani, R. A., & Olanrewaju, B. O. (2014). Avocado Pear Fruits and Leaves Aqueous Extracts Inhibit  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Glucosidase and Snp Induced Lipid Peroxidation an Insight Into Mechanisms Involve in Management of Type 2 Diabetes. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 3(5), 21–34.
- İncedayı, B., Seyhan, B., & Çopur, Ö. U. (2019). Ohmik Isıtma Destekli İşlemlerin Gıdalarda Kullanımı ve Kalite Üzerine Etkisi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(2), 341–354.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of Polyphenols with Carbohydrates , Lipids and Proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567.
- Jara, P., Barrientos, L., Herrera, B., & Sobrados, I. (2008). Inclusion Compounds of  $\alpha$ -Cyclodextrin with Alkylthiols. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(2), 1474–1476.
- Jesus, M. S., Ballesteros, L. F., Pereira, R. N., Genisheva, Z., Carvalho, A. C., Pereira-Wilson, C., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2020). Ohmic Heating Polyphenolic Extracts From Vine Pruning Residue with Enhanced Biological Activity. *Food Chemistry*, 316, 126298, 1-10.
- Jimenez, P., Garcia, P., Quitral, V., Vasquez, K., Parra-Ruiz, C., Reyes-Farias, M., Garcia-Diaz, D. F., Robert, P., Encina, C., & Soto-Covasich, J. (2020). Pulp, Leaf, Peel and Seed of Avocado Fruit: A Review of Bioactive Compounds and Healthy Benefits. *Food Reviews International*, 37(6), 619–655.
- Kamagate, M., Kouame, N. M., Koffi, E., Brice Kadja, A., Camille, K., Yao, N. A. R., Balayssac, E., Daubrey-Potey, T., Sita N'zoue, K., & Maxime Die-Kacou, H. (2016). Acute Toxicity and Hypoglycaemic Activity of the Leaf Extracts of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) in Wistar Rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(33), 690–698.
- Karabulut, G., & Yemiş, O. (2019). Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı. *Akademik Gıda*, 17(4), 526–537.
- Khajehei, F., Niakousari, M., Damyeh, M. S., Merkt, N., Claupein, W., & Graeff-Hoenninger, S. (2017). Impact of Ohmic-Assisted Decoction on Bioactive Components Extracted from Yacon (*Smallanthus Sonchifolius* Poepp.) Leaves: Comparison with Conventional Decoction. *Molecules*, 22(12), 1–15.

- Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Schweiggert, R. M., Young, G. S., Harrison, E. H., Francis, D. M., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2014). Avocado Consumption Enhances Human Postprandial Provitamin A Absorption and Conversion from a Novel High- $\beta$ -Carotene Tomato Sauce and from Carrots. *The Journal of Nutrition*, 144(8), 1158–1166.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V., & Thangavel, K. (2012). Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Catechin by Molecular Inclusion with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 255–264.
- Koller, O.C., 1992. *Abacaticultura*. 2. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 138.
- Kumar, A., Kumarchandra, R., Rai, R., & Sanjeev, G. (2017). Anticlastogenic, Radiation Antagonistic, and Anti-Inflammatory Activities of *Persea americana* in Albino Wistar Rat Model. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 488–499.
- Kumar, B., & Cumbal, L. (2016). UV-Vis , FTIR and Antioxidant Study of *Persea americana* (Avocado) Leaf and Fruit: A Comparison. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 13–20.
- Kusnadi, C., & Sastry, S. K. (2012). Effect of Moderate Electric Fields on Salt Diffusion Into Vegetable Tissue. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 329–336.
- Lakka, A., Lalas, S., & Makris, D. P. (2020). Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin as a Green Co-Solvent in the Aqueous Extraction of Polyphenols from Waste Orange Peels. *Beverages*, 6(3), 50.
- Li, W., Ran, L., Liu, F., Hou, R., Zhao, W., Li, Y., Wang, C., & Dong, J. (2019). Preparation and Characterisation of Polyphenol-HP- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex That Protects Lamb Tripe Protein Against Oxidation. *Molecules*, 24(24).
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254–260.
- Lima, C. R., Vasconcelos, C. F. B., Costa-Silva, J. H., Maranhão, C. A., Costa, J., Batista, T. M., Carneiro, E. M., Soares, L. A. L., Ferreira, F., & Wanderley, A. G. (2012). Anti-Diabetic Activity of Extract from *Persea americana* Mill. Leaf Via the Activation of Protein Kinase B (PKB/Akt) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 517–525.
- Litz, R.E., Raharjo, S.H.T., & Lim, M. G., (2007). Avocado. In: Chong PE, Davey MR (eds) *Biotechnology in agriculture forest*, Vol 60. Springer, Berlin, 167–187.

- Lopez-Cobo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Pasini, F., Caboni, M. F., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2016). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as Valuable Tools for the Determination of Phenolic and Other Polar Compounds in the Edible Part and By-Products of Avocado. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 505–513.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P., & Moontree, T. (2015). Ohmic Heating-Assisted Extraction of Anthocyanins from Black Rice Bran to Prepare a Natural Food Colourant. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 102–110.
- Makopa, M., Mangiza, B., Banda, B., Mozirandi, W., Mombeshora, M., & Mukanganyama, S. (2020). Antibacterial, Antifungal, and Antidiabetic Effects of Leaf Extracts from *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *Biochemistry Research International*, 2020.
- Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C., & Cravotto, G. (2012). A One-Pot Ultrasound-Assisted Water Extraction/Cyclodextrin Encapsulation of Resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, 130(3), 746–750.
- Markhali, F. S., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2022). Effect of Ohmic Heating on the Extraction Yield, Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Olive Mill Leaves. *Clean Technologies*, 4(2), 512–528.
- Molina-Garza, Z. J., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Quintanilla-Licea, R., & Galaviz-Silva, L. (2014). Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of 10 Medicinal Plants Used in Northeast Mexico. *Acta Tropica*, 136(1), 14–18.
- Monge-Rojas, R., & Campos, H. (2011). Tocopherol and Carotenoid Content of Foods Commonly Consumed in Costa Rica. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 202–216.
- Moongngarm, A., Sriharboot, N., Loypimai, P., & Moontree, T. (2022). Ohmic Heating-Assisted Water Extraction of Steviol glycosides and Phytochemicals From *Stevia rebaudiana* Leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 154, 112798.
- Murathan, Z. T., & Kaya, A. (2020). Alanya Ekolojik Koşullarında Yetiştirilen Has ve Fuerte Avokado Çeşitlerinin Bazı Fitokimyasal İçerikleri ile Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6), 1435–1440.
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., & Kadivar, M. (2016). Encapsulation Optimization of Lemon Balm Antioxidants in Calcium Alginate Hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(16), 1631–1644.
- Oboh, G., Isaac, A. T., Akinyemi, A. J., & Ajani, R. A. (2014). Inhibition of Key

Enzymes Linked to Type 2 Diabetes and Sodium Nitroprusside Induced Lipid Peroxidation in Rats' Pancreas by Phenolic Extracts of Avocado Pear Leaves and Fruit. *International Journal of Biomedical Science*, 10(3), 208–216.

Oboh, G., Odubanjo, V. O., Bello, F., Ademosun, A. O., Oyeleye, S. I., Nwanna, E. E., & Ademiluyi, A. O. (2016). Aqueous Extracts of Avocado Pear (*Persea americana* Mill.) Leaves and Seeds Exhibit Anti-Cholinesterases and Antioxidant Activities In Vitro. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(2), 131–140.

Ojewole, J., Kamadyaapa, D. R., Gondwe, M. M., Moodley, K., & Musabayane, C. T. (2007). Cardiovascular Effects of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) (Avocado) Aqueous Leaf Extract in Experimental Animals. *Cardiovascular Journal of South Africa*, 18(2), 69–76.

Owolabi, M. A., Coker, H. A. B., & Jaja, S. I. (2010). Bioactivity of the Phytoconstituents of the Leaves of *Persea americana*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1130–1135.

Owolabi, M. A., Jaja, S. I., & Coker, H. A. B. (2005). Vasorelaxant Action of Aqueous Extract of the Leaves of *Persea americana* on Isolated Thoracic Rat Aorta. *Fitoterapia*, 76(6), 567–573.

Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Genisheva, Z., Oliveira, H., de Freitas, V., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2016). Effects of Ohmic Heating on Extraction of Food-Grade Phytochemicals from Colored Potato. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 493–503.

Pereira, S. G., Teixeira-Guedes, C., Souza-Matos, G., Maricato, É., Nunes, C., Coimbra, M. A., Teixeira, J. A., Pereira, R. N., & Rocha, C. M. R. (2021). Influence of Ohmic Heating in the Composition of Extracts from *Gracilaria vermiculophylla*. *Algal Research*, 58, 102360, 1-12.

Plazola-Jacinto, C. P., Pérez-Pérez, V., Pereyra-Castro, S. C., Alamilla-Beltrán, L., & Ortiz-Moreno, A. (2019). Microencapsulation of Biocompounds From Avocado Leaves Oily Extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 505–511.

Polat Kose, L., Bingol, Z., Kaya, R., Goren, A. C., Akincioglu, H., Durmaz, L., Koksall, E., Alwasel, S. H., & Gülcin, İ. (2020). Anticholinergic and Antioxidant Activities of Avocado (*Folium perseae*) Leaves–Phytochemical Content by LC-MS/MS Analysis. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 878–893.

Pralhad, T., & Rajendrakumar, K. (2004). Study of Freeze-Dried Quercetin-Cyclodextrin Binary Systems by DSC, FT-IR, X-ray Diffraction and SEM Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2), 333–

- Rahman, N., & Dewi, N. U. (2018). Phytochemical and Antioxidant Activity of Avocado Leaf Extract (*Persea americana* Mill.). *Asian J. Sci. Res.*, 11(3), 357–363.
- Renard, C. M. G. C., Watrelot, A. A., & Bourvellec, C. L. (2017). Trends in Food Science & Technology Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 43–51.
- Rivai, H., Hasni, L. A., & Zulharmita, Z. (2019). Qualitative and Quantitative Analysis of the Content of Chemical Compounds from Extracts of Hexane, Acetone, Ethanol, and Water from Avocado Leaves (*Persea americana* Mill). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(6), 149–167.
- Roberts, C. G., Gurisik, E., Biden, T. J., Sutherland, R. L., & Butt, A. J. (2007). Synergistic Cytotoxicity Between Tamoxifen and the Plant Toxin Persin in Human Breast Cancer Cells is Dependent on Bim Expression and Mediated by Modulation of Ceramide Metabolism. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(10), 2777–2785.
- Rodrigues, R. M., Genisheva, Z., Rocha, C. M. R., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Pereira, R. N. (2019). Ohmic Heating for Preservation, Transformation, and Extraction. *Green Food Processing Techniques: Preservation, Transformation, and Extraction*, United Kingdom: Academic Press (Chapter 6), 159(1), 160-191.
- Saldanha do Carmo, C., Pais, R., Simplicio, A. L., Mateus, M., & Duarte, C. M. M. (2017). Improvement of Aroma and Shelf-Life of Non-alcoholic Beverages Through Cyclodextrins-Limonene Inclusion Complexes. *Food and Bioprocess Technology*, 10(7), 1297–1309.
- Turgut, Y. (2018). Makarnanın Pişirilmesinde Alternatif Yöntem Olarak Ohmik Isıtmanın Kullanılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 88s, Isparta.
- TUIK (2019). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr> (Son erişim tarihi: 17.12.2019).
- Wang, H., Wang, S., Zhu, H., Wang, S., & Xing, J. (2019). Inclusion Complexes of Lycopene and  $\beta$ -Cyclodextrin: Preparation, Characterization, Stability and Antioxidant Activity. *Antioxidants*, 8(8), 314.
- Xiao, Z., Hou, W., Kang, Y., Niu, Y., & Kou, X. (2019). Encapsulation and Sustained Release Properties of Watermelon Flavor and its Characteristic Aroma Compounds from  $\gamma$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Food Hydrocolloids*, 97(100), 105202.

- Yamassaki, F. T., Campestrini, L. H., Faria, S., Bello, J., & Maurer, B. (2017). Avocado Leaves: Influence of Drying Process, Thermal Incubation, and Storage Conditions on Preservation of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 2280–2293.
- Yang, L., Chen, W., Ma, S., Gao, Y., Huang, R., Yan, S., & Lin, J. (2011). Host–Guest System of Taxifolin and Native Cyclodextrin or its Derivative: Preparation, Characterization, Inclusion Mode, and Solubilization. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 629–637.
- Zong, W., & Bi, S. (2012). The Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Ursolic Acid with  $\gamma$ -Cyclodextrin. *Advanced Materials Research*, 403–408, 712–716.
- Zu, Y., Wu, W., Zhao, X., Li, Y., Wang, W., Zhong, C., Zhang, Y., & Zhao, X. (2014). Enhancement of Solubility, Antioxidant Ability and Bioavailability of Taxifolin Nanoparticles by Liquid Antisolvent Precipitation Technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1–2), 366–376.