



T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**STEVİA YAPRAĞI EKSTRAKTININ YAŞLANMA ÖNLEYİCİ POTANSİYELİ
ve KOZMESOTİK UYGULANMASI**

Anakhanım ASADZADE

Tez Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Shirin TARBIAT

İSTANBUL-2022

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STEVIA YAPRAĞI EKSTRAKTININ YAŞLANMA ÖNLEYİCİ POTANSİYELİ
ve KOZMESOTİK UYGULANMASI

Anakhanım ASADZADE

Tez Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Shirin TARBIAT

İSTANBUL-2022

ÖZET

Stevia Yaprağı Ekstraktının Yaşlanma Önleyici Potansiyeli ve Kozmesotik Uygulanması

Giriş: Yaşlanma hem yapısal hem de moleküler bozulma ile beraber derinin fonksiyon ve görüntüsünün kaybedilmesiyle ilişkili bir süreçtir. Bu süreçlerde iç etkenler ve dış etkenlerden etkilenmektedir. Ve yaşlanma demografik, çevresel, yaşam tarzı gibi faktörlerden oldukça etkilenmektedir.

Amaç: Bir tıbbi bitki olarak da kullanılan Stevia bitkisinin fitokimyasal ve güçlü antioksidan özellikleri sayesinde ciltte yaşlanma tedavisinde iyi bir şekilde koruyucu etkisinin araştırılması.

Yöntemler: Çalışma için *Stevia rebaudiana* bitki materyali toplanarak bitki özleri hazırlandı. Krem formülasyonu belirlendi. Antioksidan deneyleri, 1,1-Difenil-2-pikrihidrazil radikal süpürücü aktivite (DPPH) ve 2,2-azinobis 3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit (ABTS) radikal süpürme aktivite analizleri hem bitki özüne hem de Stevia ile formüle edilen krem için yapıldı. Ardından tirozinaz inhibisyon testleri ve kremin fiziksel stabilite değerlendirilmesi yapıldı. İstatiksel sonuçlar belirlendi.

Sonuç: Stevia'nın kozmetik ürünlerde stabil bir doğal antioksidan olarak kullanım için önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterildi. Çalışmada, Stevia etanolik özütünün tirozinaza karşı inhibitör aktivitesi sergiledi. Özütünün ise tek başına ve ayrıca formüle edilmiş kremin içinde tirozinaz enzimini inhibe ettiğini göstermektedir. Tüm formülasyonlar, üç ay boyunca farklı sıcaklıklara maruz kaldıklarında güçlü bir stabilite göstermiştir. Stevia içeren krem cilde uygun 5.3 ± 0.1 PH değeri göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Stevia, Antioksidan, Tirozinaz, Kozmetik

ABSTRACT

Antiaging Potential of Stevia Leaf Extract for Cosmeceutical Application

Introduction: Aging is a process associated with both structural and molecular deterioration as well as the loss of function and appearance of the skin. These processes are affected by internal and external factors including ultraviolet radiation (UV), and environmental pollution. The aging of the skin is characterized by irregular pigmentation, increased wrinkling, loss of elasticity, dryness, and roughness. The use of natural compounds in skin protection especially topical application of antioxidants indicates their popularity in decreasing the effect of aging on the skin.

Objective: The aim of the present study is to formulate and evaluate an antiaging cream containing Stevia leaves extract.

Methods: *Stevia rebaudiana* plant material was collected and plant extracts were prepared for the study. The cream formulation was determined. Antioxidant experiments was performed on both plant extract and the formulated cream containing stevia by phosphomolibdate method, 1,1-Diphenyl-2-picrihydrazil radical scavenging activity (DPPH) and 2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazollin-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity. Then, tyrosinase enzyme inhibition assay and physical stability evaluation of the cream were determined. Statistical analysis was performed.

Results: Stevia has been shown to have significant potential for use as a stable natural antioxidant in cosmetic products. In the study, Stevia ethanolic extract exhibited inhibitory activity against tyrosinase. It shows that *Stevia rebaudiana* extract, alone and also in the formulated cream, inhibits the tyrosinase enzyme. All formulations showed strong stability when exposed to different temperatures for three months. The cream containing stevia showed a PH value of 5.3 ± 0.1 suitable for the skin.

Keywords: Stevia, Antioxidant, Tyrosinase, Cosmetic

TEŞEKKÜR

Üsküdar Üniversitesi Biyoteknoloji bölümünde yürütmüş olduğum tez çalışmamda bilgi birikimi ve destekleriyle her daim beni destekleyen saygıdeğer tez danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Shirin TARBIAT'a

Deneyimlerini ve görüşlerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Muhsin, Prof. Dr. Tunç ÇATAL, Doç. Dr. Mesut KARAHAN, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gizem AVCI ve tüm Üsküdar Üniversitesi çalışanlarına

Sevgili Demet ÜNVER'e

Üniversitede tanıdığım tüm arkadaşlarım'a ve

Son olarak beni hiçbir adımım da yalnız bırakmayan, manevi desteklerini her zaman hissettiğim Çok Kıymetli Ailem'e

Teşekkür Ederim...



BEYAN FORMU

Bu çalışmamın kendi tez çalışmam olduğunu, bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çevresinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kuralların uygun olarak sunduğumu, yararlandığım kaynakları bilimsel şekilde atıflarda bulunduğuma ve tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğuna ve Üsküdar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna uygun bir şekilde yazdığımı beyan ederim.

.../.../ 2022

Anakhanım ASADZADE

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN FORMU	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Cilt Yaşlanması.....	4
2.2 İnsan Derisinin Yaşlanmasının Etiyolojileri ve Çeşitleri	5
2.2.1 İçsel Yaşlanmadaki Değişiklikler	6
2.2.2 Dışsal Yaşlanmadaki Değişiklikler.....	7
2.3 Reaktif Oksijen Türleri ve Fotoyaşlanma	8
2.4 Antioksidanların Faydaları ve Çeşitleri	14
2.5 Antioksidan Çeşitleri	16
2.5.1 Enzimatik Antioksidanlar	16
2.5.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	18
2.6 Eksojen Antioksidanlar.....	19
2.7 Tirozinaz Enzimi (EC 1.14.18.0) ve Cilt Yaşlanması	20
2.8 Fitokimyasallar	22
2.8.1 Alkaloidler	22
2.8.2 Flavonoidler	22
2.8.3 Tanenler	22
2.8.4 Saponinler	22
2.8.5 Steroidler.....	23
2.8.6 Terpenoidler.....	23
2.8.7 Fenolik	23
2.8.8 Resveratrol	23
2.8.9 Epikateşin.....	23
2.8.10 Kurkumin	24

2. Bitki Özlerinin Tıbbi veya Kozmetik Kullanımı	24
2.10 Stevia Bitkisi.....	26
2.11 Stevia Yaprağı Etanolik Özü Kimyasal Bileşimi	29
3. MATERYAL-METOT	31
3.1 Bitki Materyalinin Toplanması.....	31
3.2 Bitki Özütlerinin Hazırlanması	31
3.3 Krem Formülasyonu	31
3.4 Antioksidan Testleri.....	32
3.4.1 Fosfomolibdat Yöntemi	32
3.4.2 1,1-Difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Aktivite.....	32
3.4.3 ABTS Radikal Süpürme Aktivitesi.....	33
3.5 Tirozinaz İnhibisyon Testi	33
3.6 Kremin Fiziksel Stabilite Değerlendirmesi.....	34
3.7 İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1 Biyolojik Aktiviteler	35
4.1.1 Antioksidan Yetenek Potansiyeli.....	35
4.1.2 Enzim İnhibitör Potansiyeli	36
4.1.3 Stevia'nın Etanolik Yaprak Ekstraktının Formüle Edilmiş Kremlerdeki Enzim İnhibisyon Kapasitesi.....	37
4.1.4 PH Tayini	38
4.1.5 Stabilite Tayini.....	38
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
7. KAYNAKLAR	43
EK 1	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Daha genç ve yaşlı cilt arasındaki farklılıklar	5
Şekil 2: Cilt yaşlanmasında ROS'un moleküler mekanizmaları	12
Şekil 3: Yaşlanmanın kronolojisi.....	12
Şekil 4: Oksidatif stres ve anormal antioksidan sistem ile ilişkili çeşitli cilt bozuklukları	15
Şekil 5: Stevia rebaudiana bileşiğinin yapısı	27
Şekil 6: Stevia rebaudiana Bertoni fide hali	27
Şekil 7: Stevia rebaudiana.....	28
Şekil 8: Krem formülasyonunun gösterimi.....	32
Şekil 9: Stevia'nın etanolik yaprak ekstresi ile tirozinaz enziminin inhibisyonu	36
Şekil 10: Formüle edilmiş kremin tirozinaz enzim inhibitör etkisi	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Yaşlanma karşıtı kremler (O/W) krem formülleri.....	31
Tablo 2: Stevia rebaudiana'nın etanolik yaprak ekstraktının farklı radikal temizleme aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	35
Tablo 3: Formüle edilmiş kremlerin antioksidan kapasitesi	36
Tablo 4: Formüle edilmiş kremlerin DPPH radikal süpürücü aktivitesi	36
Tablo 5: O/W kremlerin enzim inhibisyon kapasitesi. konsantrasyonu	38
Tablo 6: Formüle edilmiş kremlerin PH değerleri.....	38



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

• ROO:	Peroksil radikalleri
AA:	Askorbik asit
ABTS:	2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)
AP-1:	Aktivatör protein 1
APX:	Askorbat Peroksidaz
ATP:	Adenozin trifosfat
BHA:	Sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianizol
BHT:	Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT:	Katalaz
CTGF:	Bağ dokusu büyüme faktörü
DHAR:	Dehidroaskorbat redüktaz
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DOPA:	(3, 4-dihidroksifenilalanin)
DPPH:	1,1-Difenil-2-pikrihidrazil radikal süpürücü aktivite
ECM:	Hücre dışı matris
ER:	Endoplazmik retikulum
GPX:	Guaiakol peroksidaz
GR:	Glutasyon redüktaz
GSH:	Glutasyon
GSSG:	Glutasyon disülfür
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
L-DOPA:	(3,4-dihidroksi-L-fenilalanin)
MAPK:	Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz
MDHAR:	Monodehidroaskorbat redüktaz
MMP:	Matriks metalloproteinazlar
MMP-12:	Metalloproteinaz-12
MMP-2:	Metalloproteinaz-2
MMP-3:	Metalloproteinaz-3
MMP-7:	Metalloproteinaz-7
MMP-9:	Metalloproteinaz-9
NADPH:	Nikotinamid-adenin dinükleotit fosfat

NF-KB:	Nükleer faktör-KB
nm:	Nanometre
O ₂ :	Oksijen
pH:	Potansiyel hidrojen
RNS:	Reaktif nitrojen türleri
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RTK:	Tirozin kinaz
SD:	Standart sapma
SG:	Steviol glikozitleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
SR:	<i>Stevia rebaudiana</i>
TBHQ:	Tert-bütilhidrokinon
TGF- β :	Dönüştürücü büyüme faktörü Beta
UV:	Ultraviyole ışın
UVR:	Ultraviyole Radyasyon
α :	Alfa
β :	Beta
γ :	Gama
δ :	Delta

1. GİRİŞ

Yüz bölgesinde yaşlanmanın oluşmasına neden olan faktörler genellikle yerçekiminin etkisi, kasların hareketi, hacim kaybı, yüzeysel-derin yağın azalması ve yeniden dağılımı, kemik iskelet desteğinin kaybının olmasına ek olarak yüzün sarkması, yüzde şekil ve kontur değişikliklerinin meydana gelmesiyle kendini göstermektedir. Yapılan çalışmalara göre yaşlanmanın patolojik bir durum olmadığı ama biyolojik olarak ise yaşlanmanın hayat boyu kaçınılmaz olduğu belirtilmektedir. Bunlara ek olarak yaşlanmanın dejeneratif bozukluklara, iyi huylu ve kötü huylu neoplazmalar dahil olmak üzere çeşitli cilt ve vücut patolojileri ile ilişkili olduğunu söylenmektedir (Ganceviciene ve ark.,).

Fotoyaşlanma'nın meydana geldiği bir cilt, solar elastoz adı verilen patolojik bir fenotip olan dermis'in derinliklerinde anormal elastik doku birikimi sonucu oluşmaktadır. Ultraviyole (UV) ışınının, elastin ekspresyonunu 4 kat arttırdığı ve proteazlar tarafından elastik lif bölünmesi ile karakterize edilen elastoliz meydana gelmektedir. Bu da kesik elastik liflerin hızlı bir şekilde meydana gelmesine neden olmaktadır. Ayrıca Matris Metalloproteinaz-2 (MMP-2), Metalloproteinaz-3 (MMP-3), Metalloproteinaz-7 (MMP-7), Metalloproteinaz-9 (MMP-9), Metalloproteinaz-12 (MMP-12), nötrofil serin proteazları katepsin G ve insan lökosit elastazının elastini ayırt edildiği söylenmektedir (Zhang ve Duan, 2018).

Kronolojik olarak yaşlanmış ciltte histolojik değişiklikler genel olarak dermiste azalmış fibroblast miktarları ve kollajen içeriği ile epidermal atrofide azalmayla meydana gelen durumlardan söz edilebilir. Özellikle stratum spinosum'u etkileyen içsel olarak yaşlanmış cildin epidermal atrofisi, uzun hücre döngüleri nedeniyle daha düşük epidermal hızı ile ilişkili olduğunu söylemek mümkündür (Kim ve Park, 2016).

Kronolojik olarak yaşlanmış bir cilt dermisinde, kolajen lifleri, güneşten korunan gençlerin cildi ile karşılaştırılığında daha gevşek, ince ve düzensiz olduğunu söylemek mümkündür. Ve genç bir ciltte mast hücreleri, fibroblast, kolajen ve elastik lif miktarları daha yüksek iken yaşlı bir ciltte tam tersi bir durum söz konusudur. Kollajen liflerindeki kronolojik değişikliklerin araştırıldığı bir çalışmaya göre menopoza giren bireylerin ilk 4 yılında kolajenin %30, ilerleyen yıllarda ise %2 oranında bir azalma olduğu bulunmuştur (Kim ve Park, 2016).

Yaklaşık olarak on yıldır yaşlanmanın ana sebebinin serbest radikal teorisi olduğu belirtilmektedir. Bu teoriye göre, organizmaların Reaktif Oksijen Türleri (ROS) tarafından üretilen oksidatif hasarı biriktirdiklerinden dolayı yaşlanmanın gerçekleştiği belirtilmektedir. ROS, çeşitli metabolik reaksiyonlar ve solunum gibi hücrel süreçler tarafından üretilen moleküler oksijenin kısmen indirgenmiş metabolitleridir. Yapılan çalışmaların sonucuna göre yaşlanmanın serbest radikal teorisini desteklediği yönündedir. Ek olarak, sarımsaktan türetilen tioallil bileşikler S-allil sistein ve S-allil-merkaptosisteinin ROS birikimini azalttığını ve C. Elegans'ın ise ömrünü uzattığı yönünde bulgular bulunmaktadır (Santos ve ark., 2018).

Yaşam tarzının cilt sağlığının yani yaşlanmasının öncelikle önlenabilir nedenleri arasında yer almaktadır. 2014'te yapılan bir Amerikan araştırmasına göre kalitesiz uyuyanların, kaliteli uykuları olanlara göre daha ileri cilt yaşlanma belirtilerinin olduğu yönünde bulgulara varılmıştır (Nanzadsuren ve ark., 2022). Ayrıca internet tabanlı bir çalışma sonucuna göre sigara içmek cilt kırışıklıklarını ve cilt yaşlanmasını önemli ölçüde etkilediği yönündedir. Bazı araştırmalarda ise güneş kreminin önemi vurgulanmış olup kırışık önleyici ürünlerin cilt yaşlanmasını olumlu yönde etkilediğini gözlemlenmiştir (Nanzadsuren ve ark., 2022).

Sentetik antioksidanlar, herhangi bir ek besin olarak faydalı olmazken insanlar üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir. Birçok sayıda yapılan çalışmalara göre bazı bitki materyallerinin oksidatif lipid ransiditesinin azaltılmasında oldukça etkili olduğunu doğrulamaktadır. Bu grup organizma üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı insanlar tarafından uzun süredir kullanılan bitkileri içerdiği bilinmektedir. Örnek olarak bitki içeriği bilinen çay, kahve, aloe, otlar ve baharat bitkileri yer aldığını söylemek mümkündür (Heş ve ark., 2019). Bu ham maddeler yüksek aktif bileşik içermekte olup etkili ve güvenli bir doğal gıda katkı maddesi kaynağı olmaları yönünde özellikleri bulunmaktadır. Yapılan araştırmalara göre etki mekanizmasına göre antioksidanlar; birincil antioksidanlar (radikal temizleyiciler), ikincil antioksidanlar (peroksit temizleyiciler) ve metal deaktivatörler (kompleks oluşturucu veya şelatlayıcı maddeler) olarak sınıflandırılmaktadır (Heş ve ark., 2019). Sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), tert-bütillhidrokinon (TBHQ), doğal olanlar ise tokoferoller, flavanoidler ve gallik asit esterler olarak bilinmektedir. İkincil antioksidanlar grubu ise tiyoeterler, metionin, metal şelatlayıcılar ve glutatyon peroksidaz gibi peroksit ayrıştırıcılarından oluşmaktadır (Heş ve ark., 2019).

Tıbbi bitkiler, Etiyopya da dahil olmak üzere Asya ve Afrika'nın gelişmekte olan ülkelerinde yaşayan insanların günlük yaşamlarında ve günümüzde bile çok önemli role sahiptirler. şıfalı bitkiler, genellikle yetersiz olan modern tıbbi tedavilerin tamamlayıcı olarak görev alabilir veya hizmet edebilirliğinin yanı sıra halkın sağlık ve güvenliğini önemli derecede arttırdığı yönünde önemli bir yer almaktadır. Bu nedenle bu bitkiler günlük yaşamda vazgeçilmez rolleri bulunmaktadır. Yani kısaca yaşam, yaşlanma, hastalık ve ölümle ilişkili çeşitli sosyal, kültürel ve ekonomik olaylarla derinden bağlantılıdır. şıfalı bitkiler hastalıkları ve enfeksiyonları tedavi etmek, teşhis etmek gibi önemli özelliklere sahiptirler (Agidew, 2022).

Bir bitki özü olarak Stevia, bugün hala popüler bir bileşen olduğu 1970'lerde Japonya tarafından bir tatlandırıcı olarak kullanılmış olup ilk kez ticari olarak kabul edilmiştir. Stevia, oğunlukla Paraguay, Kenya, Çin, Amerika Birleşik Devletleri'nde, Vietnam, Brezilya, Hindistan, Arjantin ve Kolombiya dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde yetiştirilme ve kullanılmaktadır (Ashwell, 2015).

Bizde bu çalışmamızda antioksidan içeriği bakımından güçlü bir potansiyel olan Stevia yaprağı ekstraktının kozmetikte yaşlanma önleyici potansiyeli için çalışmamızı gerçekleştirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Cilt Yaşlanması

Cilt yaşlanması zamanla farklı organlarda, dokularda ve hücrelerde belirginleşerek farklı yönler izleyen bir insanın “yaşlanma mozağının” bir parçasını oluşturmaktadır. Cilt yaşlanması, endojen-içsel (genetik, hücresel metabolizma, hormon ve metabolik süreçler) ve eksojen-dışsal (kronik ışığa maruz kalma, kirlilik, iyonlaştırıcı radyasyon, kimyasallar, toksinler) gibi faktörlerin kombinasyonundan etkilenen karmaşık bir biyolojik süreçtir (Ganceviciene ve ark., n.d.) Bu faktörler, özellikle güneşe maruz kalan cilt bölgelerinde cilt görünümünde değişiklikler meydana getirerek her cilt katmanında kümülatif yapısal ve fizyolojik değişikliklere bununla beraber ileri düzeyde değişiklikler meydana gelmektedir (Ganceviciene ve ark., n.d.).

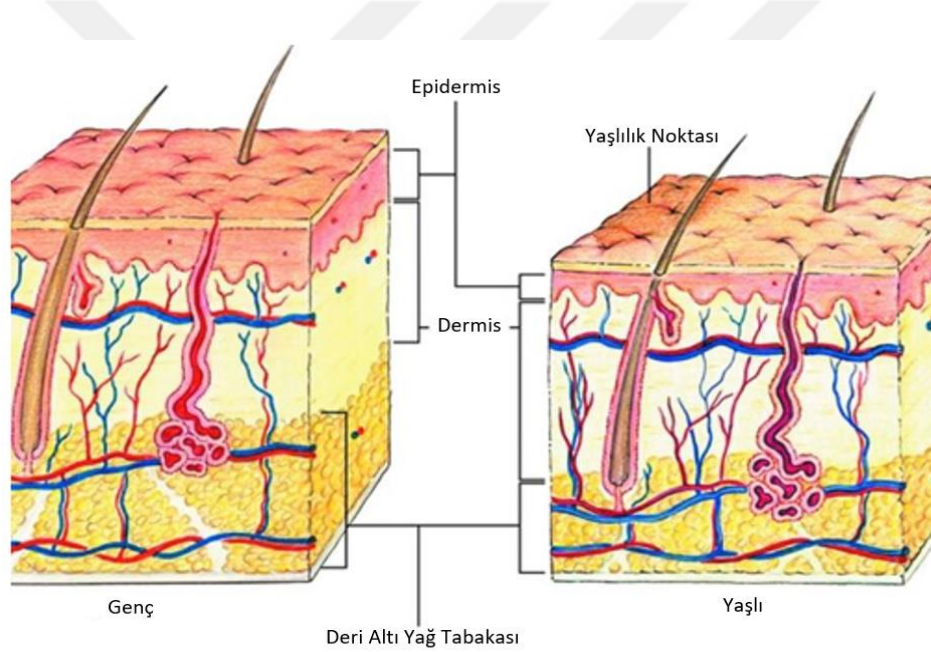
Yaşlanmış ciltte fizyolojik değişiklikler, yapısal ve biyokimyasal değişikliklerin yanı sıra nöro-duyusal algı, geçirgenlik, yaralanmaya tepki, onarım kapasitesi ve bazı cilt hastalıklarının görülme sıklığının meydana gelmesi durumudur. Hücre katmanlarının sayısı sabit kalsa da cilt, yetişkin yaşamınca zamanla incelme meydana gelir (Farage ve ark., 2013). Epidermisin kalınlığında azalma gözlenir özellikle kadınlarda görülüyor olup yüz, boyun, göğsün üst kısmı, ellerin ve ön kolların ekstansör yüzeyinde oldukça fazla görülmektedir. Dermisin moleküler bütünlüğünün kaybı, sertliğin artmasına, bükülme, uzayabilirliğinin azalması ve esnekliğin azalmasına, yaralanmalara karşı hassasiyet gibi durumlarda artışa yol açmaktadır (Farage ve ark., 2013).

Cilt yaşlanması demografik, çevresel ve yaşam tarzı gibi faktörlerden oldukça etkilenmektedir. 2019'da yapılan bir Nepal araştırmasında Kafkas veya Moğol kabileleriyle yapılmış ve artan yaş, güneşe maruz kalmanın cilt yaşlanmasının ana belirleyicilerinin olduğu sonucuna varılmıştır (Nanzadsuren ve ark., 2022). Cildin daha çok görünür bölgelerinde güneşe maruz kalmanın cilt yaşlanmasının ilerlemesini %80 oranında etki etmektedir. Bir çalışmaya göre, tüm yaş gruplarında erkeklerin kadınlara nazaran önemli ölçüde yüksek cilt yaşlanmasına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca cilt tipi de cilt yaşlanmasında önemli bir faktördür. Kuru cilde sahip kişiler, yağlı cilde göre kırışıklıklara karşı daha savunmasızdırlar (Nanzadsuren ve ark., 2022).

Yaşlanan bir ciltte meydana gelen dejeneratif değişiklikler hem moleküler hem de hücresel düzeyde olmaktadır. Bu değişikliklerin meydana getirdiği yapısal ve işlevsel bozulmanın daha derinden anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Yaşlanma, kaçınılmaz

olarak elastinin yanı sıra kolajen döngüsünde (fibroblastlarda ve bunların kolajen sentezindeki azalmaya bağlı olarak) bir azalma ile ilişkilidir (Farage ve ark., 2013). Yaşlanmış ciltteki en tutarlı yapısal değişiklik, dermo-epidermal bileşkenin üçte birinden fazla düzleşmesidir. Daha genç ve yaşlı cilt arasındaki farklılıklar şekil 1’de gösterilmektedir (Farage ve ark., 2013).

Yaşla birlikte dermis kalınlığında azalma meydana gelerek incelmeye hem vaskülaritede hem de hücresellikte bir azalma ile birlikte meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra mast hücrelerinde ve fibroblast sayısında da ciddi bir oranda azalma meydana gelmektedir. Yaş aldıkça dermisteki glikozaminoglikanların miktarı, fibroblastlar tarafından üretilen hyaluronik asit miktarı ve interfibriller temel madde de bir azalış meydana gelmektedir (Farage ve ark., 2013).



Şekil 1: Daha genç ve yaşlı cilt arasındaki farklılıklar (Farage ve ark., 2013).

2.2 İnsan Derisinin Yaşlanmasının Etiyolojileri ve Çeşitleri

Cilt yaşlanması genetik, çevresel faktörlerden etkilenen ve büyük ölçüde ultraviyole (UV) radyasyona maruz kalmaktan kaynaklanan kümülatif hasardan etkilenen karmaşık bir süreçtir. İnsan derisinin uzun süre UV radyasyonuna maruz kalması solar elastin hiperplazisine, hücre dışı matris (ECM) bozulmasına ve kırışıklık oluşumuna yol açabilir. Cilt yaşlanması hem iç hem de dış faktörlerden etkilenmektedir. İçsel veya kronolojik cilt yaşlanması, zamanın kaynaklıdır ve genetik faktörlerden etkilenir. Dış cilt

yaşlanmasına öncelikle UV ışınları neden olur ve buna fotoyaşlanma denir. Güneşe maruz kalan cilt iki tür yaşlanma süreci ortaklık etmektedir. Ortak klinik özellikleri paylaşır ve temel olarak yaşlanan ciltte kırışıklık oluşumuna, gevşekliğe ve kırılganlığa yol açan dermal matristeki değişikliklerden kaynaklanır (Kim ve Park, 2016). Cilt yaşlanması, kronolojik yaşlanma, foto yaşlanma, hormonal yetersizlikler ve çevresel faktörlerin sinerjik etkileri nedeniyle cilt kalitesinin yaşla birlikte bozulmanın meydana geldiği bir süreçtir (Chaudhary ve ark., 2020). Diğer tüm organlar gibi insan derisi de zamanla doğal bir yaşlanma sürecine girer (Shao ve ark., 2017). Ayrıca diğer organlardan farklı olarak insan cildi sürekli olarak zararlı güneş ve UV ışınları gibi çevresel kaynaklardan gelen hasara maruz kalır (Shao ve ark., 2017).

Histolojik ve ultrastrüktürel çalışmalar, cildin sırasıyla daha az sayıda epidermal keratinosit ve dermal stromal hücre içeren daha ince epidermis ile dermiş karakterize olan yaşlanma ile birlikte önemli ölçüde morfolojik değişikliklere uğradığı belirtilmektedir (Shao ve ark., 2017). Dermisin yaşa bağlı olarak incilmesi, hassaslaşması, vaskülatür desteğinin bozulması, zor yara iyileşmesini ve kanser gelişimini destekleyen doku mikro-çevresinin değişmesini arttırdığı söylenmektedir (Shao ve ark., 2017).

2.2.1 İçsel Yaşlanmadaki Değişiklikler

Kendiliğinden yani hiçbir etki olmadan yaşlanmış cilt için en önemli durum histolojik değişiklikler, bazal hücre tabakasında meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalara göre yaşlanma meydana geldikçe bazal tabakadaki hücrelerin çoğalmasında ciddi bir şekilde azalma meydana gelmektedir. Ardından epidermis daha ince bir hale gelir ve dermis ile epidermis arasındaki temas yüzey alanında azalış meydana gelir. Bunun sonucunda da epidermise besin sağlamak için daha küçük yüzey ile sonuçlanarak bazal hücre proliferasyonunun daha da zayıflamasına neden olur (Zhang ve Duan, 2018). Yapılan bir çalışmada farklı yaşlardaki insan donörlerinden deri örnekleri alınmıştır. Dermal fibroblastlarda ve epidermal keratinositlerde yaşlanma belirteci β -galaktosidaz ekspresyonunda yaşa bağlı bir artış olduğu ve bu da yaşlı cildin daha fazla yaşlanmış hücre barındırdığı anlamına gelmektedir (Zhang ve Duan, 2018). Hücresel çoğalma ve hormon seviyelerinde bir azalma meydana geldiğinde veya çeşitli faktörlerin bir sonucu olarak farklı yaşlanma belirtileri belirlemektedir. Bunlar; telomer kısalması, displastik keratinositlerin birikmesi, hücre dışı matrisin bozulması, nükleer-mitokondriyal

genlerdeki mutasyonlar ve çoklu lipid- amino asit metabolik anormalliklerinin meydana gelmesi gibi belirtilerle meydana gelmektedir (Mesa-Arango ve ark., 2017a). Bu tür rahatsızlıkların meydana gelmesi anormal su dağılımı veya higroskopik maddelerin eksikliğine bağlı fonksiyonel ve fiziksel değişikliklere neden olarak cildin kuru bir görünümüne neden olmaktadır. Ayrıca cilt yüzeyi pH'ında bir artış, mitokondride oksidatif hücre metabolizmasından ve antioksidan aktivitedeki azalmadan kaynaklanan sürekli ROS üretimi bulunmaktadır (Mesa-Arango ve ark., 2017a). Yapılan *in vivo* çalışmalar, bağ dokusu büyüme faktörünün (CTGF) ekspresyonunun ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-beta/Smad'ın azalmış bir sinyalleşmesinin, kendinden yaşlanmış ciltte tip I prokollajen ekspresyon kaybından sorumlu olduğunu göstermiştir (Mesa-Arango ve ark., 2017a).

2.2.2 Dışsal Yaşlanmadaki Değişiklikler

1969 yılında içsel faktörlerin etkisinin yanı sıra güneşe maruz kalmanın da cilt yaşlanmasına ciddi bir şekilde neden olduğu öne sürülmüştür (Zhang ve Duan, 2018). Güneş'in veya yapay kaynakların neden olduğu UV cilt fonksiyonları üzerinde ciddi bir şekilde zararlı olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca son verilere göre görünür ışığın ve kızılötesi radyasyonun da cilt hasarına yol açabileceği yönünde bilgiler mevcuttur (Mesa-Arango ve ark., 2017a). UV radyasyonuna maruz kalma dış cilt yaşlanmasının birincil faktörü olup, yüz yaşlanmasının yaklaşık olarak %80'ini oluşturmaktadır. Kendinden yaşlanmış ciltte meydana gelen ince epidermisin aksine, UV ışını ile etkilenen epidermiste kalınlaşma gözlenmektedir (Zhang ve Duan, 2018). Buna bağlı olarak UV ışınlarına maruz kalan cilt bölgelerinde keratinositlerde tip VII kollajen ekspresyonunda ciddi oranda azalma görülmektedir. Tip VII kollajen, dermal-epidermal bileşkedeki sabitleyici fibrillerdir. Üretimindeki azalma, dermis ve epidermis arasındaki zayıflamış bağlantı nedeniyle kırışıklıklara katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalara göre fotoyaşlanmış bir ciltte kolajen tip I'in artan kolajen yıkımı nedeniyle azalma meydana geldiği belirtilmektedir (Zhang ve Duan, 2018). Son olarak sigara kullanımı, otomobil kirleticileri, alkol tüketimi, beslenme alışkanlıkları, endüstriyel atıklar ve yaşam tarzı gibi çevresel faktörler yaşlanmaya katkıda bulunabildiği yönünde olgular bulunmaktadır (Mesa-Arango ve ark., 2017b).

2.3 Reaktif Oksijen Türleri ve Fotoyaşlanma

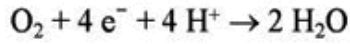
Kimyasal varlıklar gibi serbest radikallerin varlığı da 100 yıl önce anlaşılmış olup, biyolojik sistemlerdeki önemi 1950'lerin ortalarına kadar anlaşılmadığı söylenmektedir. Bununla birlikte 20. Yüzyılda ROS değişken doku hasarına ve hastalığa neden olan bir tür biyokimyasal paslanma ajanı olarak kabul edilmiştir (Ortuño-Sahagún ve ark., 2014). 21. Yüzyılda ise reaktif oksijen biyokimyası biyomedikal bilimler arasında oldukça önem arz edip şu anda da hemen hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif stres kaynaklı olduğu kabul edilmektedir. 1956'lı yıllarda, Denham Harman Yaşlanmanın Serbest Radikal Teorisi'ni önermiştir. Ayrıca Gilbert, Chance ve Commoner'ın diğer çalışmaları reaktif oksijen biyokimyasının kurucuları olarak kabul edilmektedir (Ortuño-Sahagún ve ark., 2014).

ROS üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, oksidatif hasarın ve hücrel bozulmanın indüklenmesinde önemli bir rol almaktadır. Ve fizyolojik fonksiyonlarda azalmaya neden olmaktadır. Yaşlanma süreci tüm fizyolojik fonksiyonlarda kademeli bir bozulma ile karakterize olduğu belirtilmektedir (Luceri ve ark., 2018). Bu süreçte kilit anahtar olarak rol alan ROS üretimi ile antioksidan sistemler arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres durumu meydana gelmekte olup bu durumun da oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çok çeşitli ROS türevli modifikasyonlar arasında, protein karbonillerinin oksidatif stresin başlıca ayırt edici özelliği olduğu bilinmektedir. ROS protein, lipidler ve nükleik asitler gibi birçok biyolojik makromolekülü oksidatif olarak düzenleyebilir ve bu da genetik mutasyonlarla beraber hücrel yaşlanmaya neden olabilmektedir (Luceri ve ark., 2018). Serbest radikaller, ROS birikimi yoluyla cildin yaşlanma sürecinde fazla rol aldığı belirtilmektedir (Kim ve Park, 2016). Genel olarak artan ROS üretimi, Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz'ın (MAPK) aktivasyonuna yol açar. MAPK, Aktivatör protein 1'i (AP-1) indükler, bu da Matriks metalopeptidazlar'lerin (MMP)'lerin ekspresyonunun artmasına böylece yaşlı ciltte kollajen azalmasına neden olmaktadır (Kim ve Park, 2016).

Yaşlanma, ROS oluşum hızı endojen antioksidatif sistemin ROS'u ortadan kaldırma kapasitesini aştığında dengesiz bir redoks homeostazı ile karakterize edilen artan oksidatif stres ile ilişkilidir. "Serbest Radikal Yaşlanma Teorisi" ROS üretiminin DNA, proteinler

ve lipidler dahil olmak üzere hücrel hasar birikmesine neden olduğunu ve bunun mitokondriyal bütünlükte bir düşüşe yol açtığını öne sürmektedir. Bu da ROS oluşumunun kısır döngüsünü tetikleyerek hücrel hasarı etkileyip, hücrel ve erken yaşlanmaya olumsuz bir şekilde katkıda bulunduğunu belirtilmektedir (Lam, 2016).

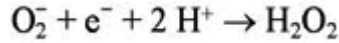
Bir oksijen molekülünün 2 molekül suya indirgenmesi, aerobik biyolojik sistemlerde ana enerji kaynağıdır. Bu indirgeme 4 elektron gerektirir.



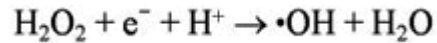
Bu elektronlar birer birer oksijene geçirilirse, bir dizi kısmen indirgenmiş ürün üretilir (Babior, 1997). Bunlardan ilki süperoksittir (O_2^-);



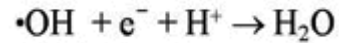
O_2^- ikinci elektron tarafından indirgenmesi hidrojen peroksit verir;



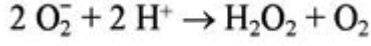
$\cdot\text{OH}$ (hidroksil radikali) artı birinci su molekülü, üçüncü elektron H_2O_2 'ye geçirildiğinde ortaya çıkar;



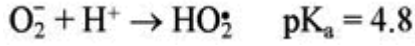
Ve son olarak, dördüncü elektron hidroksil radikalinden ikinci su molekülünü üretir;



Eşlenmemiş elektronlara sahip çoğu molekülün aksine, O_2^- şaşırtıcı bir şekilde etkisizdir. Sulu sistemlerde başlıca reaksiyonu, bir dismutasyon reaksiyonunda bir H_2O_2 molekülü ve bir oksijen molekülü oluşturmaktır (Babior, 1997).

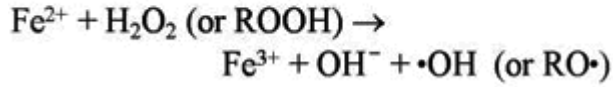
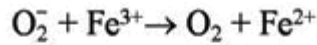


Aynı zamanda zayıf bir baz olup, konjuge asidi çok daha reaktif hidroperoksil radikalidir;



Bununla birlikte, biyolojik bağlamda önemli olan bazı diğer kimyasal özelliklere sahiptir. Bunlar;

1) OH üretmek için Haber-Weiss olarak adlandırılan reaksiyona ve alkoksil radikali ($RO\cdot$) oluşturmak için yakından ilişkili bir reaksiyona katılımını, demir veya bakır gibi geçiş metalleri tarafından katalize edilen reaksiyonları içerir (Babior, 1997).

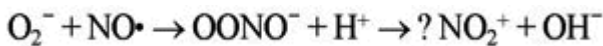


2) Haber-Weiss reaksiyonu için gerekli olan Fe^{2+} 'yi demir depolama proteini ferritinden ve akonitaz gibi demir-kükürt proteinlerinden serbest bırakarak elde etme yeteneği (Babior, 1997).

3) Singlet oksijeni oluşturmak üzere $\cdot OH$ ile reaksiyonu (Babior, 1997).



4) Nitratlama maddesi üretmek üzere parçalanmış oldukça reaktif bir oksidan olan peroksinitrit oluşturmak için nitrik oksit ile reaksiyonu (Babior, 1997).



Derinin kronik foto-hasarı, dış kaynaklı cilt yaşlanması (fotoyaşlanma) olarak kendini göstermektedir. DNA foto-hasarı ve ROS kaynaklı UV, derinin kronik foto-hasarının histolojik ve klinik belirtilerinin çoğuna yol açan ilk moleküler olaylardır. Kırıksıklık ve pigment değişiklikleri, erken foto yaşlanma ile doğrudan ilişkili olup en önemli deri belirtileri olarak kabul edilmektedir. Foto-yaşlanmayı önlemeyi amaçlayan stratejiler

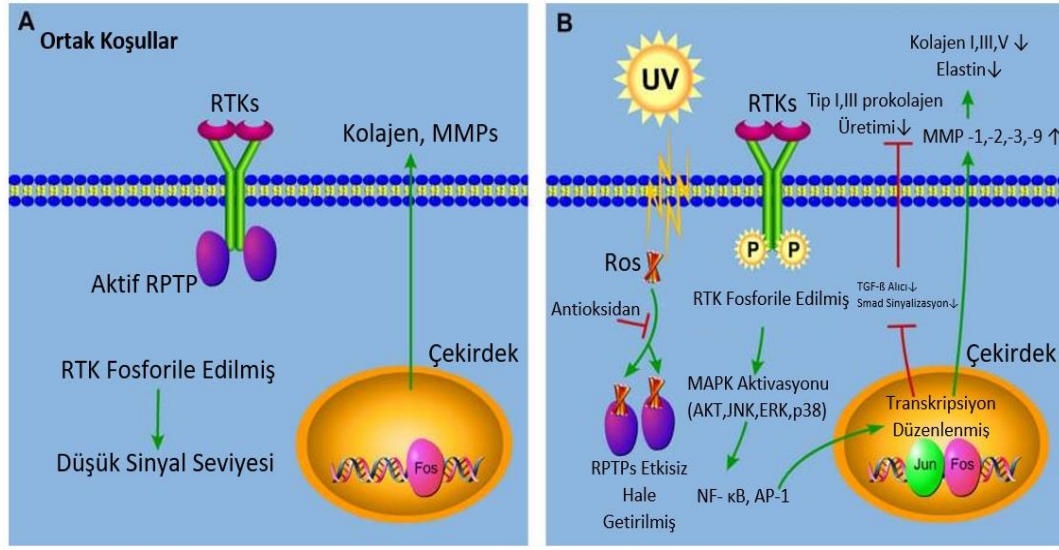
arasında güneşten kaçınma, cildin UV radyasyonuna maruz kalmasını engellemek veya azaltmak için güneş koruyucuları kullanarak güneşten korunma, kolajenaz sentezini inhibe etmek ve kolajen üretimini teşvik etmek için retinoidler ve özellikle kombinasyon ederek kullanmak ve azaltmaya yardımcı olarak antioksidanlar yer almaktadır (Ganceviciene ve ark.,).

Yaşlılıkla dermiste artan miktarda glikozaminoglikan ve proteoglikan bulunmaktadır. Bu artan bir şekilde bulunması hiperplastik fibroblast ile birlikte MMP'ler seviyesindeki artıştan dolayı olabileceği yönünde ihtimaller bulunmaktadır. Ayrıca önemli bir bilgi de fotoyaşlanmanın en belirgin histolojik özelliğinin amorf, kalınlaşmış, kıvrılmış ve parçalanmış elastik liflerin birikmesiyle meydana gelen elastik liflerin parçalanması durumu olduğunu söylemek mümkündür (Kim ve Park, 2016).

Fotoyaşlanmış cildin en göze batan özelliği, solar elastoz adı verilen patolojik bir fenotip olan dermis'in derinliklerinde anormal elastik doku birikiminin meydana gelmesidir. ROS, hem içsel yaşlanma hem de foto yaşlanmanın dermal hücre dışı matris değişikliklerinde önemli rol aldığı konusunda varsayımlar yer almaktadır. ROS, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, peroksizomal ve endoplazmik retikulum (ER) lokalize proteinleri, fenton reaksiyonu ve siklooksijenazlar, lipoksijenazlar, ksantin oksidazlar ve nikotinamid-adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazlar gibi enzimler dahil olmak üzere farklı kaynaklardan üretilebilmektedirler (Zhang ve Duan, 2018).

Aşağıda görselde de gösterilmekte olan Şekil 2-A'da ligandların olmadığı genel koşullar altında, hücre yüzeyindeki reseptör tirozin kinazların (RTK'ler) aktivitesi, RTK'leri defosforile eden ve düşük sinyal seviyelerini koruyan, normal miktarda kolajen ve MMP'ler. B'de ultraviyole radyasyon altında, RPTP'lerin katalitik bölgelerine bağlanarak, fosforile edilmiş RTK'lerin seviyesini yükselterek ve MAPK aktivasyonu dahil olmak üzere aşağı akış sinyal yollarını tetikleyerek RPTP'lerin aktivitesini engelleyen ROS üretilir ve müteakip nükleer faktör-KB (NF-KB), transkripsiyon faktörü AP-1, NF-κB ve AP-1, MMP gen transkripsiyonunu artırır. Ardından AP-1, transforme edici TGF-β tip II reseptörünün ekspresyonunu aşağı regüle ederek, transkripsiyon faktörü Smads'ın fosforilasyonunun azalmasına ve ardından kollajen üretiminin baskılanmasına neden olur. Böylece fotoyaşlanmış ciltteki toplam kolajen içeriğinde azalma meydana gelir. Antioksidanlar ROS'u nötralize etme yeteneğine sahip olup,

RPTP'lere bağlanmasını önleyebilir ve sinyali normal seviyelere geri getirebilir (Zhang ve Duan, 2018).



Şekil 2: Cilt yaşlanmasında ROS'un moleküler mekanizmaları (Zhang ve Duan, 2018).

Kronik güneş ışığına maruz kalmaya bağlı cilt hasarının meydana gelmesi özellikle açık tenli insanlarda (cilt tipleri I ve II) görünür cilt yaşlanmasının %90 oranını oluşturmaktadır. Şekil 3'te yaş aldıkça ciltte meydana gelen değişimler gösterilmektedir (Bocheva ve ark., 2019).



Şekil 3: Yaşlanmanın kronolojisi (Bocheva ve ark., 2019).

Bazı çalışmalar polifenollerin sitotoksik etki gösterebileceğini bildirmiş olsa da polifenolik bileşikler (kurkumin, yeşil çay, üzüm, soya fasulyesi, nar polifenolleri gibi) modern kozmetik ve dermatolojik ürünlerde en sık kullanılan bileşenler olup çokça tercih edilmektedir (Bocheva ve ark., 2019). Topikal nikotinamid (niasinamid ve B3 vitamini) cilt görünümünü iyileştirdiği ve fotoyaşlanmayı karakterize eden dermal kollajen kaybının önlenmesinde büyük ölçüde etkisinin olduğunu söylemektedirler. NAD'in bir öncüsü olan B3 vitamini, keratinositlerde UV kaynaklı Adenozin Trifosfat (ATP) tükenmesini önleyerek enerjiye bağlı Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) onarım süreçlerinin hızlanmasına rol alabilmektedirler. Ayrıca C ve E vitaminlerinin de güçlü antioksidan özellikleri bilinmektedir. Bu vitaminler cilt bakımı ve foto-koruma için, nutrasötikler olarak ya da topikal uygulama için yaygın olarak kullanım için çok önemlidirler. Ferulik asidin eklenmesi, vitaminlerin (C+E) kimyasal stabilitesini geliştirerek ve ışığa maruz kalan cildin foto-korumasını büyük ölçüde arttırmaktadır (Bocheva ve ark., 2019).

Cilt yaşlanmasının neden olduğu bir çalışmada vurgulanan bazı maddeler bulunmaktadır. Bunlar;

- 1) Fotoyaşlanmanın cildin üç bölümünü de etkilediğini yani epidermis, dermis ve hipodermis'in etkilenmesi olarak (Krutmann ve ark., 2017).
- 2) Dermal kompartmandaki değişiklikler doğada birincil gibi görünürken, epidermisteki değişikliklerin ikincil olduğu yani yaşlı fibroblastlar epidermal yaşlanmayı parakrin mekanizmalar yoluyla gerçekleştirmektedirler (Krutmann ve ark., 2017).
- 3) Tüm UV dalga boylarının, yani UVB, UVA2 ve UVA1 radyasyonunun insan derisinin fotoyaşlanmasına katkıda bulunduğunu (Krutmann ve ark., 2017).
- 4) Fotoyaşlanmaya karşı duyarlılığın deri pigmentasyonu, DNA onarımı, antioksidan savunma gibi insan derisinde bulunan ve farklı etnik gruplar, yaş grupları arasında farklılık gösterebilen endojen koruma sistemlerinden ve bu gruplardaki genetik farklılıklardan dolayı güçlü bir şekilde etkilendiği (Krutmann ve ark., 2017).
- 5) Hem akut stres tepkileri (hücre dışı matrisi parçalayan enzimlerin, proinflamatuvar sitokinlerin upregülasyonu gibi) hem de çoğalmayan deri hücrelerinde makromoleküler hasarın birikmesinin neden olduğu kronik hasar tepkileri (mitokondriyal DNA hasarı, oksitlenmiş proteinler gibi) cilt yaşlanma sürecini hızlandırır (Krutmann ve ark., 2017).

2.4 Antioksidanların Faydaları ve Çeşitleri

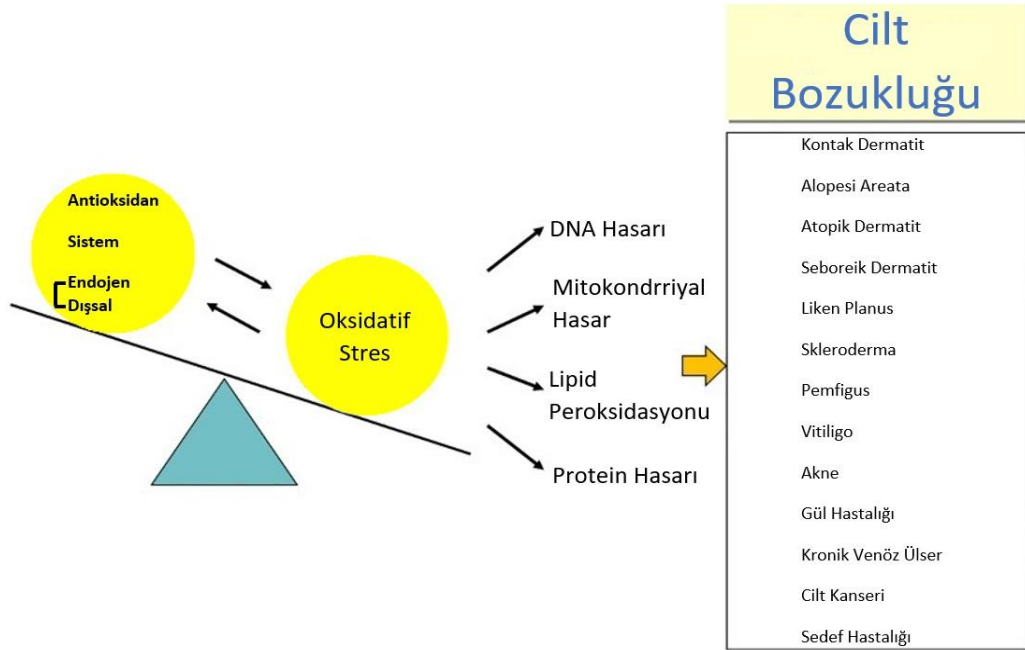
Antioksidanlar, bileşiklerin oksidasyonunu önleyen maddeler olduğunu söylemek mümkündür. Kimyasal değişimlere hassas gıda ürünlerinde oksidasyona bağlı gıda bozulmasının önüne geçmek için antioksidanlar çok önemli bir yer alarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanların çok etki gösterebilir de (BHA, BHT, TBHQ), işlenmiş gıdalarda doğal içerik maddelerinin uygulanması için büyük oranda artan tüketici isteği bulunmaktadır (Heş ve ark., 2019). İnsan vücudu üzerindeki antioksidanların olumlu etkilerinden dolayı bitkiler önemli bir yer almaktadır. Örneğin meyve, sebze, çay, otlar ve baharatlar vereilebilir. Bu hammaddelerdeki A, C, E, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi antioksidan vitaminlerin yüksek içeriğine sahip olması, lipid oksidasyonunu azalmasında güçlü bir etki göstermesi ve güvenli doğal antioksidan katkı maddeleri kaynağı olmalarını sağlamaktadır (Heş ve ark., 2019). Bitkilerde flavonoidler, yaygın olarak bulunmaktadır. Flavonoidler; hidroksil, peroksil ve süperoksit radikalleri dahil olmak üzere serbest radikalleri temizleme gücüne sahip olan ve katalitik metal iyonlarıyla birlik oluşturarak onları etkisiz hale getiren doğal polihidroksile aromatik bileşik gruplarıdır (Heş ve ark., 2019).

Bir antioksidan, serbest radikale bir elektron vererek onu nötralize etmesi ve böylece zarar verme gücünü azaltacak kadar kararlı bir moleküldür. Bu antioksidanlar esas olarak serbest radikal süpürücü özellikleri sayesinde hücresel hasarın gecikmesine veya engellenmesinde büyük rol oynamaktadır. Bu düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilir ve hayati moleküllerde herhangi bir hasar almadan zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. Ayrıca antioksidanların bazıları vücutta metabolizma sırasında üretilir bunlar; Glutatyon, ubiquinol ve ürik asit olduğunu söylemek mümkündür (Lobo ve ark., 2010). Vücutta serbest radikalleri temizleyen birkaç enzim sistemi olmasına rağmen bazı antioksidanlar vücutta bulunmaz ve dışarıdan alınması gerekir. Bunlar mikrobisin (vitaminler) antioksidanları olarak adlandırılmaktadır. Bunlar; E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve B-karotenlerdir (Lobo ve ark., 2010).

Antioksidan kaynakları olarak kabul edilen meyvelerin ve sebzelerin önemli miktarda tüketilmesi birçok hastalığa karşı koruyucu özellikleri bulunmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amiotropik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların olası tedavi seçeneği olarak bitkiler yer

almaktadır. Ayrıca hücrelerdeki aşırı oksidatif hasarın oluşması birçok rahatsızlığı beraberinde getirmektedir. Bunlar; romatoid, artrit, kardiyovasküler bozukluklar, ülserojenez ve kazanılmış immün yetmezlik hastalıkları gibi çeşitli patolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bu yüzden antioksidanların bu hastalıkların tedavisinde önemli bir yer aldığını söylemek mümkündür (Sindhi ve ark., 2013).

Antioksidanlar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar; endojen ve eksojen olarak (Baek ve Lee, 2016). Eksojen antioksidanları gıda alımı yoluyla elde edebilmektedir. Bu antioksidan sınıfına veya bunları içeren gıdalara örnek olarak likopen, kurkumin, yeşil çay, Coffea Arabica, silimarin, polipodium leucotomos, resveratrol, üzüm çekirdeği ekstresi, nar, piknogenol, soya izoflavonları, propolis ve skualen olarak söylemek mümkündür (Baek ve Lee, 2016). Şekil 4'te Oksidatif stres ve antioksidan sistem dengesinin sağlanamaması sonucunda meydana gelen cilt bozuklukları gösterilmektedir.



Şekil 4: Oksidatif stres ve anormal antioksidan sistem ile ilişkili çeşitli cilt bozuklukları (Baek ve Lee, 2016).

2.5 Antioksidan Çeşitleri

2.5.1 Enzimatik Antioksidanlar

Farklı hücrelerde lokalize olan ve antioksidanları içeren enzimler arasında;

Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Askorbat Peroksidaz (APX), Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), Glutasyon Redüktaz (GR) ve Guaiacol Peroksidaz (GPX) yer almaktadır (Das ve Roychoudhury, 2014).

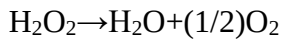
2.5.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD (süperoksit dismutaz) (E.C.1.15.1.1) tüm aerobik organizmalarda yani her yerde bulunan metalloenzimler ailesine aittir. Çevresel stresler altında SOD, ROS kaynaklı hasarlara karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. SOD, $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'ye dismutasyon yaparak $O_2^{\bullet-}$ 'nin çıkarılmasını katalize eder (Das ve Roychoudhury, 2014).



2.5.1.2 Katalaz (CAT)

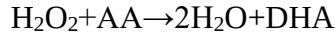
CAT (katalaz) (E.C.1.11.1.6) H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dismutasyonunu katalize etmekten sorumlu tetramerik heme içeren bir enzim grubudur. H_2O_2 yüksek affiniteye sahiptir. Ama organik peroksitler (R-O-O-R) için daha az özgülüğe sahip olduğu belirtilmektedir. Stresli koşullarda hücrenin daha fazla enerji üretimi ve harcamasını gerektirir. Bu durum H_2O_2 üreten artan katabolizma ile yerine getirilmektedir. CAT, H_2O_2 'yi enerji açısından bir şekilde ortadan kaldırır.



2.5.1.3 Askorbat peroksidaz (APX)

APX (askorbat peroksidaz) (E.C.1.1.1.11.1) Askorbat-Glutasyon (ASC-GSH) döngüsünün ayrılmaz bir bileşenidir. CAT ağırlıklı olarak H_2O_2 'yi peroksizomlarda ortadan kaldırırken, APX sitozol ve kloroplastta aynı işlevi yerine getirmektedir. APX,

indirgeyici ajan olarak Askorbik asit (AA) kullanarak H_2O_2 'yi H_2O ve DHA'ya indirgemektedir.



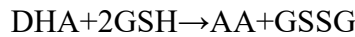
2.5.1.4 Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR)

MDHAR (monodehidroaskorbat redüktaz) (E.C.1.6.5.4), NADPH'ı indirgeyici ajan olarak kullanarak kısa ömürlü MDHA'dan AA'nın yeniden üretilmesinden ve sonuçta hücrel AA havuzunu yenilenmesinden sorumludur. AA'yı yeniden ürettiği için, APX'in H_2O_2 'yi temizlediği ve işlem sırasında AA'yı oksitlediği peroksizomlarda ve mitokondride APX ile birlikte lokalize olduğu belirtilmektedir (Das ve Roychoudhury, 2014).



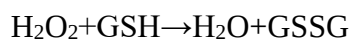
2.5.1.5 Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR)

DHAR (dehidroaskorbat redüktaz) (M.C.1.8.5.1), elektron donörü olarak İndirgenmiş Glutatyon (GSH) kullanarak dehidroaskorbatı (DHA) AA'ya indirger (Das ve Roychoudhury, 2014).



2.5.1.6 Guaiakol Peroksidaz (GPX)

GPX (guaiakol peroksidaz) (E.C.1.11.1.7) hem normal metabolizma hem de stres sırasında fazla H_2O_2 'yi ortadan kaldıran, 40-50 kDa monomerlerden oluşan hem içeren bir enzimdir. Ligninin biyosentezinde hayati bir rol oynamakta olup indol asetik asidi (IAA) parçalayarak bu süreçte H_2O_2 kullanarak biyotik strese karşı güçlü koruma sağlar (Das ve Roychoudhury, 2014).



2.5.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar AA, Glutasyon (GSH), a-tokoferol, karotenoidler, fenolikler, flavonoidler ve amino asit ozmolit prolinden oluşan antioksidan makinenin diğer yarısını oluşturur (Das ve Roychoudhury, 2014).

2.5.2.1 Askorbik Asit (AA)

AA, en bol bulunan ve en çok çalışılan antioksidan bileşiktir. Çok çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlara elektron verebilmesinden dolayı güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir. AA %90'ı sadece sitozolde değil, büyük ölçüde apoplastta da yoğunlaşmış olduğunu söylemek mümkündür. Bu nedenle onu ROS saldırısına karşı ilk savunma hattı yapar (Das ve Roychoudhury, 2014).

2.5.2.2 Glutasyon (GSH)

Glutasyon sitozolde, ER, mitokondride, kloroplastlarda, vakuolde, peroksizomlarda ve apoplast gibi hemen hemen tüm hücresel bölgelerde bol miktarda bulunmaktadır. Bunlar (γ-glutamil-sisteinil-glisin) düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol tripeptiddir. Hücre farklılaşması, hücre büyümesi-bölünmesi, hücre ölümü, yaşlanması, sülfat taşınmasının düzenlenmesi, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi gibi birçok süreçlerde görev almaktadır. GSH'nin bu çok yönlülüğü yüksek indirgeme potansiyelinden kaynaklanmaktadır. Nükleofilik karaktere sahip merkezi bir sistein kalıntısı, indirgeme gücünün kaynağıdır. GSH, H₂O₂, 1O₂, OH• ve O•⁻²'yi temizler ve eklentiler oluşturarak (glutathiolated) veya ROS, organik serbest radikallerin varlığında onları indirgeyerek ve bir yan ürün olarak Glutasyon disülfür'ü (GSSG) meydana getirir. Bu sayede farklı biyomolekülleri korumaktadır (Das ve Roychoudhury, 2014).

2.5.2.3 a-tokoferol

a-tokoferol, ROS ve lipid radikallerinin etkili süpürücüleri olan, onları biyolojik zarların vazgeçilmez koruyucuları ve temel bileşenleri yapan bir lipofilik antioksidanlar ailesine aittir. α-tokoferol'ün 4 izomeri bulunmakta olup (α-, β-, γ-, δ-) α-tokoferol, en

yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu araştırmalar sonucu söylenmektedir (Das ve Roychoudhury, 2014).

2.5.2.4 Karotenoidler

Karotenoidler hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan bitki dokularının plastidlerinde lokalize olan lipofilik antioksidanlar ailesine aittir. Karotenoidler sadece bitkilerde değil, mikroorganizmalarda da fazlaca bulunmaktadır. 450-570 nm'de ışığı emen ve enerjiyi klorofil molekülüne aktaran bir grup anten molekülüne aittirler (Das ve Roychoudhury, 2014).

2.5.2.5 Flavonoidler

Bitkiler aleminde yaygın olarak yapraklarda, çiçek organlarında ve polen tanelerinde flavonoidler bolca bulunmaktadır. Flavonoidler yapılarına göre 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; flavonoller, flavonlar, izoflavonlar ve antosiyaninlerdir. Bitki üremesinde, polenlerin çimlenmesinde ve bitki patojenlerine karşı savunmada yer alan çiçeklerde, meyvelerde ve tohumlarda pigmentasyon sağlama gibi çeşitli önemli görevleri bulunmaktadır (Das ve Roychoudhury, 2014).

2.6 Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanların birçoğu tekli oksijen ($^1O_2$) anyonunun hidrojen vericileri veya söndürücüleri olan doğal bileşiklerdir. Serbest radikal ara maddelerini uzaklaştırma veya oksidatif reaksiyonları geciktirme yeteneğine sahiptirler. Diyetlerden elde edilen doğal antioksidanlar arasında A, C, E vitaminleri ve farklı işlev gören çeşitli bitki bileşenleri bulunmaktadır. Bitki kaynaklarından gelen antioksidanların özellikle karotenoidler, flavonoidler, fenoller, vitaminlerin karsinogenezin erken ve geç aşamalarını baskıladığı söylenmektedir (George ve Abrahamse, 2020).

A vitamini, β -karotenden üretilir ve dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoproteinleri azaltma etkisinden dolayı sistemik hastalıklara özellikle koroner kalp hastalıklarına karşı hayati rol oynayan güçlü bir antioksidandır (George ve Abrahamse, 2020). Karotenoidler, lipoproteinler olarak membranlarda α veya β izoformları olarak bulunan ve tekli oksijeni

($^1 O_2^-$) ve ayrıca peroksil ($^* ROO$) radikallerini süpüren lipitte çözünür antioksidanlardır (George ve Abrahamse, 2020). Vitamin C (askorbik asit), indirgeyici eşdeğerler kullanarak veya GSH ile kombinasyon halinde lipid membranlarda E vitamini (α - tokoferol) rejenere edebilen ve suda çözünür serbest radikal süpürücü olarak rol almaktadırlar.

Askorbik asidin lipid peroksidasyonu sırasında ilk olarak askorbat radikallerine dönüştür ve ardından iki askorbat radikali molekülü birleşerek askorbat ve dehidroaskorbat oluşturmaktadır. Yağda çözünen E vitamini önemli olarak antioksidan aktivitesini hücre zarlarının ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin lipid peroksidasyonunu sonlandırarak gösterir. Böylece E vitamini, zarları stabilize etmede yapısal bir rol ile hücreleri lipid peroksidasyonundan korur. E vitamininin rejenerasyonu askorbatlar, glutatyonlar veya üratlar ile sulu arayüzde meydana gelir. Alternatif olarak, tokoferol kinon oluşturmak için oksitlenebilir veya hücrede stabil kalması için dimerize edilebildiği belirtilmektedir (George ve Abrahamse, 2020).

2.7 Tirozinaz Enzimi (EC 1.14.18.0) ve Cilt Yaşlanması

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) enzimi hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda eksprese edilen bakır içeren karışık fonksiyonlu bir oksidazdır. Ek olarak tirozinaz, enzimatik esmerleşmeyi ve melanin sentezini katalize eden anahtar hız sınırlayıcı bir enzimdir. Tirozinaz ayrıca L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonunu ve L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonunu katalize eden mono fenolaz ve di fenolaz aktivitelerine sahiptir ve mono fenolaz ve di fenolaz enzimatik olmayan polimerizasyona uğrayarak koyu pigmentler üretebilme özelliğine sahiptir (Ebanks ve ark., 2009); (Ramsden ve Riley, 2014). İnsanlarda, tirozinazın aşırı ekspresyonu ciltte melaninin aşırı üretimine yol açarak çillenme, melazma, yaşlılık lekeleri ve melanom gibi hiperpigmentasyon etkilerini tetikler (Yamaguchi ve ark., 2007). Kojik asit gibi çeşitli sentetik tirozinaz inhibitörleri, kozmetikte cilt rengi açıcı ajanlar olarak yaygın olarak kullanılan literatürde rapor edilmiştir. Bununla birlikte bu bileşiğin bu ortamda kullanılması, eritem ve kontakt dermatit dahil olmak üzere bazı ciddi yan etkilere neden olabilir (Ando ve ark., 2010);(Ortonne, 2012).

Cilt yaşlanması yaşın, hormonların ve UV maruziyeti gibi birçok bireysel içsel ve dışsal faktörün neden olduğu karmaşık bir biyokimyasal süreçten meydana gelmesinden

dolayı (Graghani ve ark., 2014) matriks metalloproteinazlar'ın (MMP), ECM degradasyonu üzerindeki etkisi nedeniyle cilt gerilme mukavemetini kaybetmekte önemli rolleri bulunmaktadır. Bu süreç sırasında cilt kırışır ve hipo veya hiper pigmentasyon gibi bazı pigment anormallikleri ile pürüzlülük ve kuruluk belirginleşir (Quan ve ark., 2009); (Costin ve Hearing, 2007). Hiperpigmentasyonu tedavi etmek için tirozinaz inhibitörleri üzerinde çalışılmıştır. Tirozinaz, tirozini melanine dönüştüren hız sınırlayıcı bir enzimdir (Bae-Harboe ve Park, 2012). Bu nedenle tirozin inhibitörleri cilt aydınlatıcı ajanlar olarak önemli bir rol oynamaktadır.

Genellikle tirozinaz aktivitesini inhibe etmek için dört 4 yol olduğu söylenmektedir;

- a) Enzimin aktif bölgesinde bakırın şelatlama aktivitesini etkilemek, böylece bakır iyonlarının oksijene bağlanmasını önlemek, tirozinazın geri dönüşümsüz deaktivasyonuna yol açmak (Souza ve ark., 2012).
- b) Güçlü bir antioksidanın eklenmesi, böylece oksijenin tirozinaz tarafından aktivasyonunun önlenmesi (Boonsiripiphat ve Theerakulkait, 2009)
- c) Melanin oluşumunu önlemek için bir serbest radikal süpürücü ajanın kullanılması (Fatiha ve ark., 2015).
- d) Rekabetçi inhibitörlerin kullanımı yani yüksek antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleri olan bileşikler, tirozinazı inhibe edebilir (Nagarani ve ark., 2014).

2.8 Fitokimyasallar

Fitokimyasal özelliklerin analizi için kullanılan bitkilerin çoğu kısmı yapraklar, kökler, gövde kabukları ve meyveler olduğunu söylemek mümkündür (Agidew, 2022).

2.8.1 Alkaloidler

Alkaloidler, bitkiler tarafından üretilen ana ve en büyük bileşen olduğu belirtilmektedir. Amino asitlerden türetilen metabolik yan ürünleri arasındadır (Agidew, 2022).

2.8.2 Flavonoidler

Flavonoidler, bir benzoil-y-piron yapısına sahip büyük bir polifenol bileşik grubundan oluşur ve bitkilerde her yerde bulunur. Fenilpropanoid yolu ile sentezlenmektedirler. Mevcut raporların sonucuna göre flavonoidler de dahil olmak üzere fenolik yapıya sahip ikincil metabolitlerin, farmakolojik faaliyetlerin çeşitliliğinden sorumlu olduğunu göstermektedir. Flavonoidler ayrıca hidrosillenmiş fenolik maddelerdir. Ve mikrobiyal enfeksiyona yanıt olarak bitkiler tarafından sentezlendiği söylenmektedir (Agidew, 2022).

2.8.3 Tanenler

Çeşitli makromoleküllerle güçlü kompleksler oluşturmak için yeterli hidrosillere ve karboksil gibi diğer uygun gruplara sahip, polifenol doğasına sahip karmaşık bir büyük biyomoleküle Tanen denilmektedir. Tanenlerin en büyük etkileri arasında iltihaplanma, yanık, kazık ve bel soğukluğunda iyileştirici temsilcileri olduğunu söylemek mümkündür (Agidew, 2022).

2.8.4 Saponinler

Saponinler, bitki krallığında yaygın olan ve çok önemli bir bitki sekonder metabolit grubu olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca saponinler genel olarak sebze, fasulye ve şifalı bitkide bulunan fitokimyasallardır (Agidew, 2022).

2.8.5 Steroidler

Steroid kelimesi, doğal veya sentetik kimyasal olarak aktif hormon benzeri bir element olan sterolden türetilmiştir. Steroid, belirli bir karbon yapısına göre sınıflandırılan büyük bir kimyasal madde grupları arasında yer almaktadır (Agidew, 2022).

2.8.6 Terpenoidler

Terpenoidler, bitkiler tarafından sentezlenen küçük moleküler ürünlerdir ve en yaygın doğal ürün grubu olduğunu söylemek mümkündür. Terpenoidler'in önemli farmakolojik aktiviteler arasında antiviral, antibakteriyel, antimalaryal, anti-inflamatuar, kolesterol sentezinin inhibisyonu ve anti-kanser aktiviteleri olduğunu söylemek mümkündür (Agidew, 2022).

2.8.7 Fenolik

Fenolik bileşikler, bitkilerin şikimik asidinde ve fenilpropanoid metabolizasyonu yoluyla pentoz fosfatta üretilen ikincil metabolitler grubudur (Agidew, 2022).

Yaşlanma Karşıtı Fitokimyasallar ise aşağıda yer almaktadır.

2.8.8 Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, çeşitli meyveler, kakao ve birçok bitki kaynaklı gıdada bulunan polifenolik küçük bir moleküldür (Si ve Liu, 2014).

2.8.9 Epikateşin

(-)-epikateşin bir flavanol olan, elma, çilek, çikolata, üzüm, armut ve çay dahil olmak üzere çeşitli yiyeceklerden bulunmaktadır. Ayrıca kakao çekirdeği en yüksek epikateşin seviyelerine (43.270 mg/kg taze ağırlık) sahip olduğu söylenmektedir. Bu da yaklaşık olarak 8.000 mg/kg içeren bir sonraki en yüksek epikateşin içeren ürün olan yeşil

çaydan çok daha fazla olduğu yönünde sonuçlar bulunmaktadır (Si ve Liu, 2014). Yeni yapılan epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen verilere göre günlük olarak büyük miktarda kakao içeceği tüketen San Blas Adası'nda yaşayan insanların, iskemik kalp hastalığı, felç, diyabet insidansının önemli ölçüde daha düşük olduğunu ve diğerlerine kıyasla önemli ölçüde daha uzun bir ömre sahip olduğu yönünde kanıtlar bulunmaktadır (Si ve Liu, 2014).

2.8.9.1 Kuersetin

Kuersetin (3,3,4,5,7-pentahidroksiflavon), üzüm, yaban mersini, kiraz, soğan, elma ve brokoli dahil olmak üzere birçok meyve ve sebzede bol miktarda bulunan bir flavonoiddir. Yapılan çalışmalara göre 200 mM'de diyetle kuersetin takviyesinin *C. elegans*'ın ömrünü %20 oranında uzattığı bildirilmiştir. Yakın tarihli bir çalışma, kuersetin ve türevi kuersetin kaprilatın, yaşlanan fibroblastları canlandırabildiğini ve proteazomu aktive ederek yaşam süresini uzattığı söylenmektedir (Si ve Liu, 2014).

2.8.10 Kurkumin

Kurkumin (diferuloilmetan), köksapı baharat zerdeçal sağlayan *Curcuma longa* da dahil olmak üzere 31 tür zerdeçal bitkisinde bulunan başlıca bir curcuminoid olduğunu söylemek mümkündür (Si ve Liu, 2014). Kurkumin yüzyıllardır geleneksel Çin ve Hint tıbbında mide rahatsızlığı, şişkinlik, dizanteri, ülser, sarılık, artrit, burkulmalar, yaralar, akne ve cilt ve göz enfeksiyonları gibi birçok rahatsızlıkların tedavisinde öncül olarak kullanılmaktadır (Si ve Liu, 2014).

2.9 Bitki Özlerinin Tıbbi veya Kozmetik Kullanımı

Yasal bir değeri olmamasına rağmen, kozmetik terimi tıbbi özelliklere sahip ve teşvik eden aktif maddeler içeren kozmetik ürünleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu nedenle kozmetiklerin bileşimi, yararlı bir yerel etki sergileyen ve cilt bozulmasını önleyen tıbbi özelliklere sahip bileşenler içerir. Sağlıklı cilde gerekli besinleri sağlayarak görünümünün iyileştirmesinde rol almaktadırlar. Kırışıklıkları azaltırken cilt tonunu, dokusunu ve parlaklığının iyileştirilmesinde de rol almaktadırlar.

Kozmetikler, doğal kişisel bakım endüstrisinin hızla büyüyen bir bölümüdür. Doğal içerikler yüzyıllardır cilt bakımında geleneksel olarak kullanılırken, modern formülasyonlarda daha yaygın hale gelmektedir.

Doğal terimi, doğa tarafından üretilen veya doğada bulunan ve doğrudan bir bitki veya hayvan ürününden elde edilen bir şey ya da içerik olarak tanımlanmaktadır. Doğal içerik kaynakları otlar, meyveler, çiçekler, yapraklar, mineraller, su ve toprağı içerebilir. Bitkilerin tıbbi amaçlı kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir ve gelecek yıllar içerisinde doğal yağlar ve şifalı otlar içeren yeni ürünlerin piyasada var olacağını söylemek mümkündür (Ribeiro ve ark., 2015).

İnsan cilt koşullarının ve görünümünün iyileştirilmesi binlerce yıldır araştırılmakta ve insanlığa eşlik ederek modern kozmetiklere dönüşmüştür. Cilt, çevreyle ara yüzümüzü sağlayarak bizi aktif olarak saldırganlardan korumaktadır. Bitkilerin cilt üzerinde önemli özellikleri bulunmakta olup hem cildi yatıştıran hem de koruyan maddeler sayesinde önemli bir rol almaktadır. Modern kozmetikler artık sadece hidrasyonu iyileştirmek ve kızarıklığı gidermekle kalmadığı bunun yanında cildin elastik özelliklerinde değişikliğinden ve ortam kirleticilerinden de koruma sağlamaktadır. Yıllarca süren bitkilerin insan derisi üzerindeki geleneksel kullanımı nedeniyle takdir edilmesine neden olmuştur. Cildin bitkilerle geleneksel tedavisi, renk bozulmalarını, elastikiyetteki değişiklikleri ve hatta tıbbi durumları hedef alan çaylar, infüzyonlar, merhemler ve kremleri barındırmaktadır (Faccio, 2020).

Yaklaşık olarak 5 bin yıldan daha uzun bir süre önce Mısırlıların kekik, papatya, lavanta, zambak, nane, biberiye ve aloe gibi bugün kozmetik için doğal içerik olarak kullandığımız bitkileri geçmişten kullanıldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu bitkilerin kullanımı daha sonra Roma ve Yunan uygarlıkları tarafından da benimsenerek kullanılmıştır (Faccio, 2020).

Bitkiler gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılan malzemelerin ana kaynakları arasında yer almaktadır. Birçok takviye, nutrikozmetik ve kozmetik birçoğunun geleneksel veya halk hekimliğinde uzun bir kullanım geçmişine sahip botanik bileşenlere dayandığı yönünde olgular bulunmaktadır (Michalak, 2022). Botanik bazlı formülasyon bileşenlerinin özellikle cilt yaşlanmasının önlenmesinde ve foto-koruyucu özelliğine sahip olan antioksidanların nutrasötikler olarak adlandırılan oral takviye şeklinde de kullanılabilmektedir (Michalak, 2022).

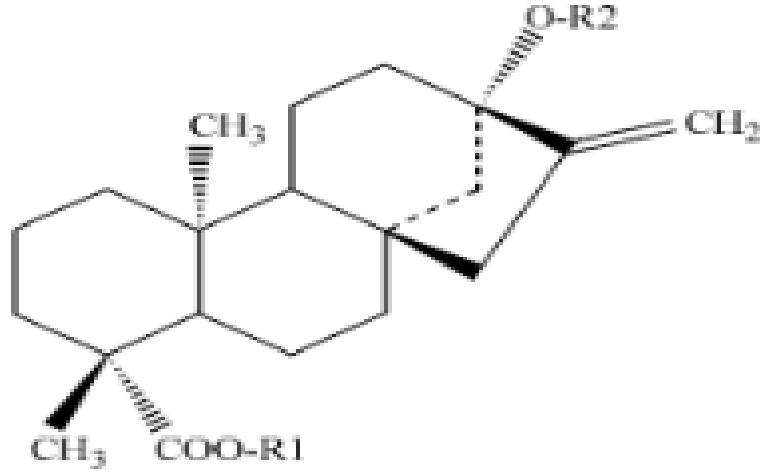
Doğal bir şekilde elde edilen içerikler ve içeriği tamamen organik kozmetik ürün barındıran kozmetik ürünler, günümüzde bir gün geçtikçe popülerlik kazanmıştır. Gelecekte de bu ürünlere yönelik tüketiciyi cezbedeceği yönünde beklentiler yer almaktadır (Nadeeshani Dilhara Gamage ve ark., 2022). Yapılan bir çalışmaya göre kozmetiklerin bileşenleri olarak doğal ürünler genellikle güvenlik, belirgin aktivite ve kaliteli olacak şekilde ilişkilendirilmektedir. Ve doğal kökenli kozmetik ürünlere büyük ilgi bulunmaktadır (Koch ve ark., 2019). Ayrıca bitkilerin deri hücrelerinin çoğalmasının iyileştirmesinde önemli rol oynadığını söylemek mümkündür (Zagórska-Dziok ve ark., 2021).

Son olarak kozmetik formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan boyaların çoğu sentetiktir ve kimyasal reaksiyonlarla elde edilmektedirler. Doğal kozmetikler söz konusu olduğunda, üreticiler genellikle daha güvenli toksikolojik görünüme sahip gıda boya, demir oksitler, aktif kömür, krom oksitler veya ultramarin gibi mineral pigmentler kullanmaktadırlar (Bujak ve ark., 2021).

2.10 Stevia Bitkisi

Stevia rebaudiana (Bertoni) Stevioside, Bertoni yapraklarındaki ana tatlandırıcıdır. Sakarozdan yaklaşık 300 kat daha tatlıdır (%0,4 solüsyon). Stevia'nın tatlı bileşeninin yapısı, Şekil 5'te gösterildiği gibi esas olarak yapraklarda bulunur. Çeşit ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak içeriği kuru yaprak ağırlığının %4 ile %20'si arasında değişiklik göstermektedir (Geuns, 2003). Stevia türünün en az 110'u tanımlanmıştır. Şekil 6'da ve şekil 7'de Stevia'nın otsu hali yer almaktadır (Carrera-Lanestosa ve ark., 2017); (Arumugam ve ark., 2020). 1970'lerden bu yana ekstraksiyonun geliştirilmesi ardından rafinaj ve renk giderme ile Stevia'nın ticari vurgusu Japonya'da daha yaygın olmuştur (Jahangir Chughtai ve ark., 2020). Steviol glikozitlerin (SG'ler) kullanımı artık şeker kamışı, pancar şekeri, bal gibi kalori bakımından zengin şekere kitlelerin bağımlılığını en aza indirmek için gıda katkı maddesi olarak teşvik edilmekte olup diyabet ve buna bağlı hastalıkların insidansının azalmasına yardımcı olmaktadır (Jahangir Chughtai ve ark., 2020). Normalde Stevia, dünyanın farklı yerlerinde Mart-Nisan ve Haziran-Temmuz aylarında yetiştirilmektedir. Hasat dönemi ise 75-90 gün sonra yapılır. Stevia'nın ham özü ve steviosid içeriği, toprağın pH'ı düştüğünde artar ve bu da nihayetinde Stevia'nın tatlılık

seviyesini arttırır (Jahangir Chughtai ve ark., 2020). Stevia 20–24°C'de olacak şekilde, toprak pH'ı 4–6 olacak şekilde yetiştirilmektedir (Jahangir Chughtai ve ark., 2020).



Şekil 5: *Stevia rebaudiana* bileşiğinin yapısı (Geuns, 2003).



Şekil 6: *Stevia rebaudiana* Bertoni fide hali (Carrera-Lanestosa ve ark., 2017).



Şekil 7: *Stevia rebaudiana* (Arumugam ve ark., 2020).

Stevia bitkisi Güney Amerika'ya özgü olup yüz yıla aşkın bir süredir yerli halk tarafından tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Farhat ve ark., 2019). Bitki içecekleri tatlandırmak için kullanmıştır. Genellikle de "tatlı bitki" olarak adlandırılan bitki yaprakları kurutularak çayları ve ilaçları ve tatlandırmak için kullanmışlardır (Ashwell, 2015).

1931'de Fransız kimyagerler Briedel ve Lavieille, Stevia'ya tatlı tadı veren glikoziti izole ettiler. Bu bileşiğe steviosid adı verildi (Peteliuk ve ark., 2021). İkinci Dünya Savaşı sırasında şeker kıtlığı ve tüketiminin paylaşılması nedeniyle Stevia Birleşik Krallık'ta aktif olarak tüketilmeye başlanmıştır. 1970'lerde, Stevia Japonya'da tanıtılmış olup insan sağlığı için yararlı potansiyelini değerlendirmek için araştırmalar başlamıştır. O zamandan beri Japonlar bu tatlandırıcıyı çeşitli yiyeceklerde aktif olarak kullanmaktadır. Ayrıca 2013 yılında Coca-Cola Company şeker yerine Stevia içeren ve %30 daha az kalori içeren içeceklerin üretimine başlamıştır (Peteliuk ve ark., 2021). Stevia yaprakları, esas olarak steviosid, rebaudiosit A, rebaudiosit B, rebaudiosit C ve rebaudiosit E gibi içerikleri içermekte olup herhangi bir mutajenik, teratojenik veya kanserojen etki gözlemlenmemiştir (Youssef ve ark., 2021). Ancak daha düşük konsantrasyonlarda bulunan diğer bileşikler şunlardır: stevioside 2, rebaudiosit A4, B5, C6, D7, E8, F9 ve dulcoside A 10 olacak şekilde. Ekstrakttaki steviosid ve rebaudiozit B'nin varlığı ekstraksiyon işleminin bir eseri olabilir. Güney Amerika, Asya, Japonya, Çin ve Avrupa'da farklı ülkelerde uzun yıllardır Stevia bitkisi, ekstraktları ve steviosid

tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Stevia yaprakları, steviosid ve yüksek oranda rafine özler resmi olarak Brezilya, Kore ve Japonya'da düşük kalorili tatlandırıcılar olarak kullanılmaktadır (Geuns, 2003).

Stevia rebaudiana gıda ve kozmetik endüstrilerinde de bitkisel ilaçlarda kullanımı giderek artan önemli doğal bir tatlandırıcı bitkilerden biridir. Steviol glikozitlerin yukarıda belirtilen tüm özellikleri bitkisel ilaçlarda, gıda endüstrisinde (tatlılar, soslar, ketçaplar, içecekler, ekmek, meyve suları) ve kozmetikte (gargaralar ve diş macunları, kremler)de kullanımı bulunmaktadır (Dyduch-Siemińska ve ark., 2020). Ayrıca endüstriyel işlemler için stevioside göre daha yüksek bir rebaudiosit A konsantrasyonu istenmektedir çünkü pazar tarafından takdir edilmeyen bir özellik olan güçlü bir acı kalıntı tada sahip olmasından kaynaklandığını söylemek mümkündür (Gomes ve ark., 2018).

Ayrıca *Stevia rebaudiana* (SR) yapraklarından elde edilen ekstrakt 200°C'de stabildir, kalori içermez, fermente olmaz, diş plağı oluşturmaz hatta çürük önleyicidir, karamelize olmaz ve kristalleşmez. Bu nedenle SR yapraklarından elde edilen ekstrakt, çeşitli endüstrilerde birden fazla kullanıma sahiptir (Carrera-Lanestosa ve ark., 2017). Son olarak insülin seviyesini arttırarak pankreas dokusunda faydalı aktiviteler sergilemektedir. Ve inflamasyonu, oksidatif yanıtı azaltarak normal kan şekeri seviyesinin korunmasına yardımcı olmaktadır (Jan ve ark., 2021).

2.11 Stevia Yaprağı Etanolik Özü Kimyasal Bileşimi

Stevia rebaudiana Bertoni; diterpenler, triterpenler, stigmasterol, tanenler, uçucu yağlar ve sekiz diterpenenik glikozitten oluşan karmaşık bir yapıdan meydana gelmektedir. Steviosid, steviobioside, dulcoside ve rebaudiosid A, B, C, D ve E. En bol bulunan maddeler steviosid ve rebaudiosit A'dır. Stevia glikozitlerinden rebaudiosit A en tatlı ve en kararlı olanıdır ve stevioside'dan daha az acıdır (Pasquel ve ark., 2000). Bu acı tattan seskiterpen laktonlarının sorumlu olduğu düşünülmekteydi ama kariofilen ve spatulenol'ün ağızda kalan tada kesin olarak katkıda bulunduğunu öne sürülmüştür ve bundan kaynaklandığı söylenmektedir (Pasquel ve ark., 2000). Tatlı tat C-13 hidroksil ve C-19 karboksil grupları tarafından sağlanır. Stevioside, stevioside, isosteviol ve rebaudiosit A, B, C, D, E ve F bitkilerde bulunan başlıca glikozitlerdir. Stevioside ve

rebaudiosit C ve A şekerden sırasıyla 250-300, 50-120 ve 250-450 kat daha tatlıdır. Rebaudiosit A ve D, alkali hidroliz altında rebaudiosit B'ye dönüştürülebilir. Bu ikili yüksek oranda çözünür formdadır ve insan vücudunda yan etkileri olmaksızın metabolize edilebilir. Her ikisinin de en çekici özellikleri ısıya dayanıklı (200°C'ye kadar), suda yüksek oranda çözünür, pH kararlı ve fermente edilemez olmalarıdır (Mlambo ve ark., 2022).

Yapılan bazı çalışmalarda Stevia yapraklarına farklı kimyasallar yüklendiğini iddia edilmektedir. Kimyasallar arasında dokuz temel amino asit yani glutamat, aspartat, metionin, tirozin, prolin, alanin, izolösin, lizin ve serin bulunduğu ancak triptofan hariç tüm esansiyel amino asitlerin Stevia'nın yapraklarında bulunduğunu bildirmiştir Lemus- (Mlambo ve ark., 2022). Ayrıca yağ asitleri yani linoleik asit, linolenik, oleik, stearik, palmitoleik ve palmitik asit de bulunmaktadır. Kalsiyum, fosfor, magnezyum, demir, sodyum, çinko ve potasyum gibi minerallerin yanı sıra B12 vitamini, C vitamini ve folik asit gibi vitaminler de bulunmaktadır. Son olarak Stevia yapraklarında kimyasal bileşim açısından terpenler ve flavonoidlerin daha çok bulunduğunu söylemek mümkündür. Bunun yanı sıra Stevia yapraklarında fenollerin ve kumarinlerin de varlığını bildirmiştir (Mlambo ve ark., 2022).

Kısaca *Stevia rebaudiana* aşağıdaki polifenollerin varlığını yapılan çalışmalarda doğrulamış olup içeriğinde Yapraklar: kafeik asit, 4-kumarik asit, sinnamik asit, siringik asit, vanilik asit, 4-metoksibenzoik asit, 4-metilkatekol, gallik asit, pirogallol, trikafeoilkinik asit, 3,4,5-trikafeoilkinik asit, 1,3,5-trikafeoilkinik asit, rutin, 3-feruloil-5-kafeoilkinik asit, 4-kafeoil-5-feruloilkinik asit, 3,5-dikafeoilkinik asit (izoklorojenik asit A), 1,4-dikafeoilkinik asit, 3,4-dikafeoilkinik asit (izoklorojenik asit. B), 1,3-dikafeoilkinik asit, 4,5-dikafeoilkinik asit (izoklorojenik asit). C), kersetin-3-O-glikozit, galuteolin, kuersetin, gülosit, 3-feruloilkinik asit, 5-feruloilkinik asit, 4-kafeoilkinik asit (kriptoklorojenik asit), 3-kafeoilkinik asit (klorojenik asit), 4-kafeoilşikimik asit, 3-kafeoilşikimik asit, 5-kafeoilkinik asit (neoklorojenik asit), 5-p-kumaroilkinik asit, 5-kafeoilşikimik asit, kateşin, luteolin, sinapik asit ve trans-ferulik asit olacak şekilde içeriği bulunmaktadır (Mlambo ve ark., 2022).

3. MATERYAL-METOT

3.1 Bitki Materyalinin Toplanması

Bitki materyali olan yaprakları, Temmuz ayında Burdur (Türkiye) kıyılarındaki doğal biyotoplarından toplanmıştır.

3.2 Bitki Özütlerinin Hazırlanması

Stevia bitkisi Burdur ilinden bir çiftçi yardımıyla toplanarak temin edilmiş olup, çalışmada kuru hali kullanılmıştır. Kurutulmuş ve pudra edilmiş 50 gram Stevia bitki yaprağı %96 etil alkolle 1 gün karıştırma cihazında ısı olmadan aralıklı olarak karıştırıldı. Bu işlem 3 kere tekrarlandı. Özüt filtre kağıdıyla süzildükten sonra su ve etanol vakum altında rotary evaporatörde 40°C’ de buharlaştırıldı ve 45°C’de 72 saat inkübatörde bekletildi. Elde edilen madde 4.015 g, kazınarak tartıldı. Kapalı tüplerde folyolanarak - 21°C’de saklanarak analizlerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

3.3 Krem Formülasyonu

Poliakrilamid (%3), C13–14 izoparafin (%5), Gliseril (%6), Laureth 7 (%3), etil heksanoat (%5), Sepicide HB (%0,5), bitki özütü (%2, 4 mg mL) krem ve damıtılmış su içinde olacak şekilde oluşturulmuştur. Şekil 8’de krem formülasyonunun görseli gösterilmektedir.

Tablo 1: Yaşlanma karşıtı kremler (O/W) krem formülleri

Formülasyonlar	İçindekiler
F1	Baz krem (negatif kontrol)
F2	Baz krem + %2 C Vitamini (pozitif kontrol)
F3	Baz krem + %2 Stevia özütü



Şekil 8: Krem formülasyonunun gösterimi

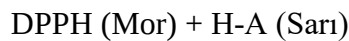
3.4 Antioksidan Testleri

3.4.1 Fosfomolibdat Yöntemi

Toplam Antioksidan Kapasitesinin Fosfomolibdat Yöntemi ile Değerlendirilmesi Antioksidan kapasitesinin kantitatif tespiti için spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir (Prieto ve ark., 1999).Tahlil, numune tarafından MO (VI) 'nın MO (V)' e indirgenmesine ve ardından asidik pH'ta yeşilimsi mavi bir fosfat / MO (V) kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır. İndirgeyici bir tür (etanol içinde) içeren 0,1 ml'lik bir numune çözeltisi, 1 ml reaktif çözeltisi (0,6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum Fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ile bir Eppendorf tüpünde birleştirildi; tüpler kapatıldı ve bir termal blok içinde 95°C'de 90 dakika süreyle inkübe edildi. Numuneler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, her birinin sulu solüsyonunun absorbansı 695 nm'de bir blank'a göre ölçüldü. Tipik bir blank çözelti, 1 ml reaktif çözeltisi ve numune için kullanılan aynı çözücünün uygun hacmini içeriyordu ve numunelerin geri kalanıyla aynı koşullar altında inkübe edildi. Bileşimi bilinmeyen numuneler için, yağda çözünür ve suda çözünür C vitamini pozitif kontrol olarak ifade edildi.

3.4.2 1,1-Difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Aktivite

DPPH ve antioksidan madde arasındaki süpürücü reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Antioksidan, stabil bir serbest radikal olan DPPH * ile reaksiyona girerek DPPH'ye indirgenir. Bunun sonucunda absorbansı, DPPH * radikalinden DPPH-H formuna kadar düşer. Özütlarin antioksidan bileşiklerinin süpürücü potansiyeli, hidrojen bağışlama

yeteneği açısından, renk değiştirme derecesini belirtir. Analiz, (Villaño ve ark., 2007)metoduyla belirtildiği gibi uygulanmıştır. Metot; metanol içinde yapılan 4 ml özüt çözeltisi, 1 ml DPPH * zeltisine (1 mM) eklendi. Karışım çalkalanarak ve 20°C’de 30 dakika beklemeye bırakıldı. Elde edilen çözeltinin absorbansı, spektrofotometre ile 517 mm’de ld. Özütlerin antioksidan kapasiteleri yapılan krem ierisinde1 ml kremi etanol da çözerek aynı şekilde ld. Deney 0, 14 ve 28 gün kremin yapılmasından sonra formüle edilen kremler için tekrarlandı.

3.4.3 ABTS Radikal Süpürme Aktivitesi

ABTS*+ radikal süpürme aktivitesinin spektrofotometrik analizi, (Re ve ark., 1999) yöntemine göre belirlendi. Katyonik radikal ABTS*+, kullanımdan önce karanlıkta oda sıcaklığında 12 saat süreyle saklanan H₂O'daki 7 mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfat arasındaki reaksiyonu ile üretildi. ABTS*+ zeltisi, fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4) ile 734 nm’de 0.700'lk bir absorbans elde etmek üzere seyreltildi. Daha sonra, 1 ml ABTS*+ solüsyonu eklenmiştir ve etanol içinde 3 ml zeytin yaprağı ekstresi (%20 oleuropein) farklı konsantrasyonlarda (10-50 g/ml) eklenmiştir. 30 dakika sonra, blank absorbansa (distile su) göre her konsantrasyonuin 734 nm’de yüzde inhibisyon hesaplanmıştır. ABTS*+ süpürme kapasitesi aşağıdaki formülle kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{ABTS radikali Süpürme aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

A kontrol, ABTS*+'ın başlangıç konsantrasyonudur.

A numune, ekstrakt varlığındakı ABTS*+ konsantrasyonunun absorbansıdır.

Özütlerin antioksidan kapasiteleri yapılan krem içerisinde 1 ml kremi etanol da çözerek aynı şekilde ld. Deney 0, 14 ve 28 gün kremin yapılmasından sonra formüle edilen kremler için tekrarlandı.

3.5 Tirozinaz İnhibisyon Testi

Tirozinaz inhibisyonu, daha önce tarif edildiği gibi DOPA krom oluşumunun lmesiyle belirlendi. Kısaca, EO numuneleri çözücü içinde değişen

konsantrasyonlarda (10, 100 ve 250 µg/mL) çözündürüldü. Örnekler 96 oyuklu bir plakada hazırlandı ve bileşenler aşağıdaki gibi eklendi:

Fosfat tamponu (120 µL, 20 mM, pH 6.8), 20 µL numune ve 20 µL mantar tirozinaz (20 mM fosfat tamponunda 500 U/mL). 25 °C'de 15 dk inkübasyondan sonra her kuyuya 20 µL L-tirozin solüsyonu (0.85 mM) eklenerek ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilerek reaksiyon başlatıldı.

Enzim aktivitesi, 470 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi. Pozitif kontrol olarak Vitamin C (Askorbik asit) kullanıldı. Yüzde tirozinaz inhibisyonu şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Tirozinaz inhibisyonu (\%)} = [(A - B) - (C - D)] / (A - B) \times 100$$

Burada A, enzimli kontrolün absorbansı, B enzimsiz kontrolün absorbansı, C enzimli test numunesinin absorbansı ve D enzimsiz test numunesinin absorbansıdır (Cui ve ark., 2018).

3.6 Kremin Fiziksel Stabilité Değerlendirmesi

Fiziksel stabilite, Formülasyonların stabilitesi, 3 ay boyunca 8°C ± 0.1°C, 25°C ± 1°C, 40°C ± 1 °C olmak üzere üç sıcaklıkta tabi tutularak değerlendirildi. pH ölçümleri için başlangıçta ve daha sonra 15 günlük aralıklarla numuneler toplanmıştır. Ölçümler giderek daha yüksek dönüş hızlarında yapılmıştır. Distile su içinde 1: 10'a seyreltilen formülasyonların pH'ı Thermo Orion model 410 (Thermo Orion, Beverly, MA, ABD) kullanılarak ölçüldü. Ölçümler, analiz edilen her numune için oda sıcaklığında üç kopya halinde yapılmıştır.

3.7 İstatiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD, n = 3) olarak sunulmuştur. İstatiksel analizler, Student t test ve SPSS sürüm 16.0 kullanılarak tek yönlü bir ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Önemli farklılıklar P < 0.05.

4. BULGULAR

4.1 Biyolojik Aktiviteler

4.1.1 Antioksidan Yetenek Potansiyeli

4.1.1.1 Stevia'nın Etanolik Yaprak Ekstresinin Antioksidan Aktivitesi

Stevia'nın etanolik yaprak özütü, çalışılan tüm yöntemlerde antioksidan aktivite sergilemiştir (Tablo 2'de gösterilmektedir). Phosphomolibdat yöntemiyle elde edilen ekstrakttaki daha yüksek polifenol içeriği, muhtemelen daha büyük antioksidan aktiviteye katkıda bulunmuştur.

Tablo 2: *Stevia rebaudiana*'nın etanolik yaprak ekstraktının farklı radikal temizleme aktiviteleri üzerindeki etkisi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 3); Farklılıklar $p < 0.05$ 'te anlamlıydı. IC_{50} = enzim aktivitesinde %50 kayba neden olan inhibitör konsantrasyonu.

IC_{50} Değerleri $\mu g/ml$		
Antioksidan tahlilleri	Askorbik asit	<i>Stevia rebaudiana</i> 'nın etanolik yaprak özütü
Fosfomolibdat yöntemi ile toplam antioksidan aktivite	96.66 ± 1.2	100.02 ± 1.1
DPPH radikal süpürücü aktivite	27.2 ± 1.1	34.5 ± 0.01
ABTS radikal süpürücü aktivite	50.16 ± 1.5	54.45 ± 1.2

4.1.1.2.2. Formüle Edilmiş Kremlerde Stevia'nın Etanolik Yaprak Ekstraktının Antioksidan Aktivitesi

Kremlerin farklı zaman aralıklarındaki antioksidan yetenekleri DPPH ve ABTS olmak üzere iki yöntemle değerlendirilmektedir (Tablo 3 ve Tablo 4). Her iki yöntemde de Stevia'nın etanolik yaprak özütü (F3) içeren formülasyon, üç zaman aralığının tamamında antioksidan aktivite sergiledi; bununla birlikte, formülasyonun antioksidan etkisindeki değişiklik zaman içinde önemli değildi. DPPH testinde 94.3 ± 1.12 ila 96.00 ± 1.13 mg/ml arasında değişen IC_{50} değerleri ile ve ABTS testinde 74.01 ± 2.0113 mg/ml idi. F3, kontrol C vitamini ve Baz Krem ile karşılaştırıldığında güçlü antioksidan aktivite gösterdi. Baz krem antioksidan aktivite göstermedi Tablo 3'te ve Tablo 4'te özetle gösterilmektedir.

Tablo 3: Formüle edilmiş kremlerin antioksidan kapasitesi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 3); aynı üst simge harflerle işaretlenen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P < 0.05). IC₅₀ = enzim aktivitesinde %50 kayba neden olan inhibitör konsantrasyonu. ND = belirlenmedi.

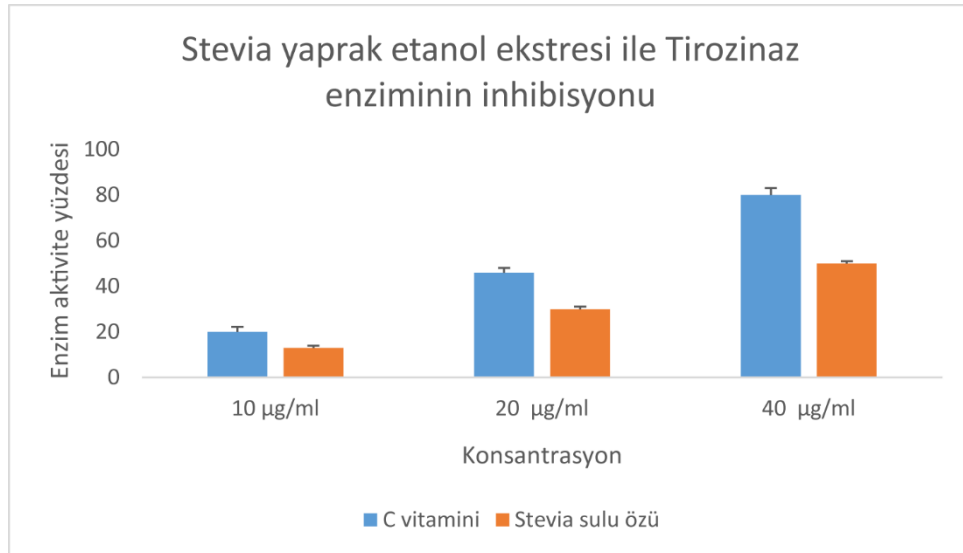
Formülasyonlar	DPPH Tahlili		
	IC ₅₀ (mg/ml)		
	0 gün	14 gün	28 gün
F1	ND	ND	ND
F2	45.68 $\pm$ 1.03	67.8 $\pm$ 1.1	72.2 $\pm$ 1.1
F3	94.3 $\pm$ 1.12 ^a	95.82 $\pm$ 1.03 ^a	96.00 $\pm$ 1.13 ^a

Tablo 4: Formüle edilmiş kremlerin DPPH radikal süpürücü aktivitesi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 3); aynı üst simge harflerle işaretlenen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P < 0.05). IC₅₀ = enzim aktivitesinde %50 kayba neden olan inhibitör konsantrasyonu. ND = belirlenmedi.

Formülasyonlar	ABST Tahlili		
	IC ₅₀ (mg/ml)		
	0 gün	14 gün	28 gün
F1	ND	ND	ND
F2	63.27 $\pm$ 1.34 ^a	66.03 $\pm$ 1.4 ^{ab}	69.01 $\pm$ 1.05 ^b
F3	74.01 $\pm$ 2.01 ^c	74.03 $\pm$ 2.1 ^c	74.0 $\pm$ 2.3 ^c

4.1.2 Enzim İnhibitör Potansiyeli

Stevia'nın etanolik yaprak ekstresi ile tirozinaz enziminin inhibisyonu şekil 9'da gösterilmektedir.

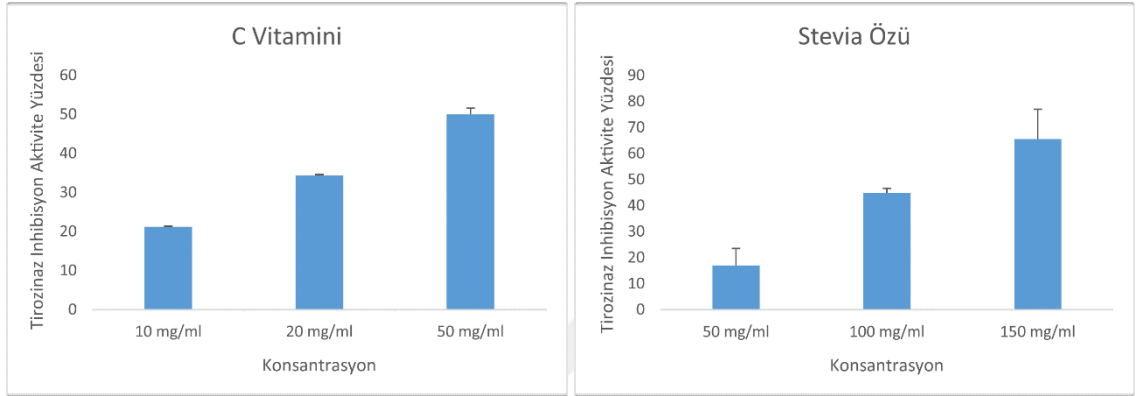


Şekil 9: Stevia'nın etanolik yaprak ekstresi ile tirozinaz enziminin inhibisyonu. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD'dir (n=3). Çubuk çiftleri arasındaki farklar önemlidir (p< 0.05).

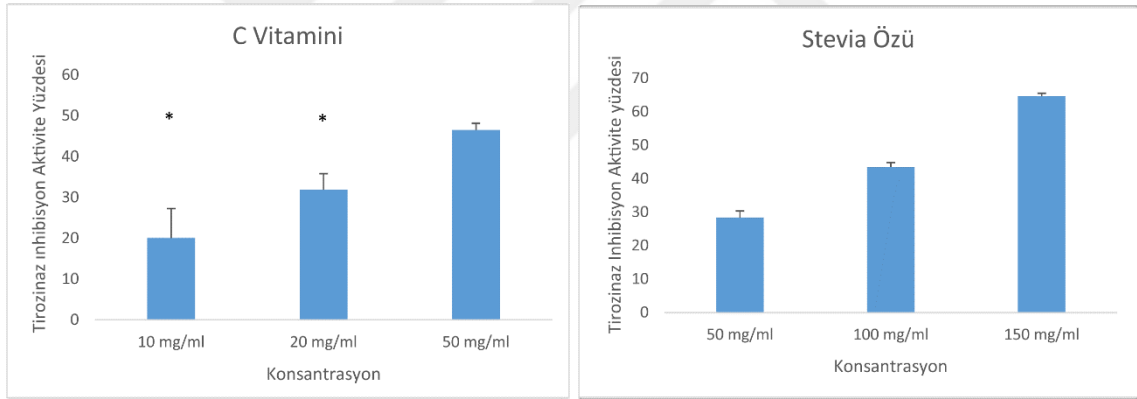
4.1.3 Stevia'nın Etanolik Yaprak Ekstraktının Formüle Edilmiş Kremlerdeki Enzim İnhibisyon Kapasitesi

Şekil 10'da ve Tablo 5'te, formüle edilmiş kremin enzim inhibitör potansiyelini bildirir. F3, F1 ve F2'ye kıyasla güçlü tirozinaz inhibe edici etki sergiledi.

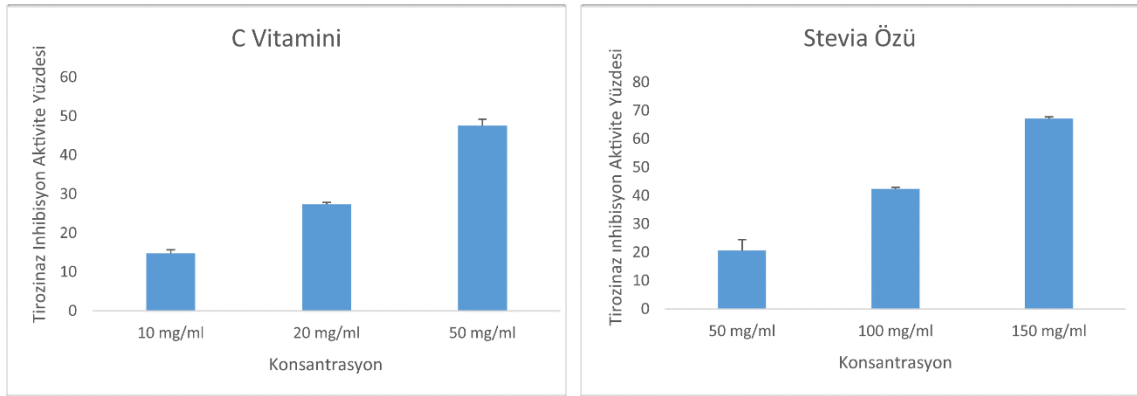
0 Gün



14 Gün



28 Gün



Şekil 10: Formüle edilmiş kremin tirozinaz enzim inhibitör etkisi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 3). (*) ile işaretlenen çubuk çiftleri önemli ölçüde farklı değildir.

Tablo 5: O/W kremlerin enzim inhibisyon kapasitesi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 3); aynı üst simge harflerle işaretlenen değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P < 0.05$). IC_{50} = enzim aktivitesinde %50 kayba neden olan inhibitör konsantrasyonu. ND = belirlenmedi.

IC_{50} (mg/mL)				
Enzim	Formülasyonlar	0 Gün	14 Gün	28 Gün
Tirozinaz	F1	ND	ND	ND
	F2	32.8 ± 2.8^a	33.72 ± 2.87^a	52.7 ± 3.1
	F3	112.46 ± 3.2^b	113.16 ± 1.8^b	114.25 ± 2.08^b

4.1.4 PH Tayini

Formüle edilmiş kremlerin PH değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir. F3'ün PH'si F2'ye kıyasla daha düşüktü, ancak üç zaman aralığında PH değerlerindeki değişim $P < 0.01$ 'de önemli ölçüde farklı değildi.

Tablo 6: Formüle edilmiş kremlerin PH değerleri

PH Değerleri O/W Kremler			
Formülasyonlar	0 Gün	14 Gün	28 Gün
F1	6.70 ± 0.1	6.75 ± 0.08	6.7 ± 0.05
F2	5.8 ± 0.08	5.8 ± 0.2	5.8 ± 0.3
F3	5.28 ± 0.1	5.3 ± 0.1	5.34 ± 0.15

4.1.5 Stabilite Tayini

Formülasyonların stabilitesi, 3 ay boyunca $8^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ olmak üzere üç sıcaklıkta belirlendi. Tüm formülasyonlar, üç ay boyunca farklı sıcaklıklara maruz kaldıklarında güçlü bir stabilite göstermiştir.

5. TARTIŞMA

UV ışınlarından kaynaklanan birçok toksik madde ve ROS cilde nüfuz ederek cilt tümörleri, cilt kırışması ve cilt yaşlanması gibi çeşitli cilt hastalıklarında rol oynar. Antioksidan savunmanın çoklu hatları gelişmiş olup insan cildini önleme ve onarım da dahil olmak üzere oksidatif stresten korumaya hizmet etmektedir. Birincil savunma mekanizmaları, reaktif türleri doğrudan temizleyerek oksidatif hasarı önler. İkincil savunma mekanizmaları, lipid peroksidasyonu gibi ROS tarafından ortaya çıkarılan süreçleri tamamlar. Bir yaklaşım da cildin antioksidanlarla takviye edilmesi ve böylece antioksidan kapasitesinin güçlendirilmesidir (Ahsanuddin ve ark., 2016). Bitki kaynaklı antioksidan bileşenler, vücudu serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin neden olduğu hasarlardan koruma yeteneğine sahip hayati maddelerdir (Amarowicz ve Pegg, 2019).

Bu çalışmada, bir Stevia bitkisi yaprağı etanolik özünü kullandık ve antioksidan kapasitesini Phosphomolibdat, DPPH $\cdot$ -serbest radikal ve ABTS $\cdot$ -serbest radikal yöntemleri ile değerlendirdik. (Tablo 2)

DPPH $\cdot$ ve ABTS $\cdot$ tahlilleri, fitoteknoloji, gıda teknolojisi ve farmakoloji/toksikolojide serbest radikal temizleme kapasitesinin ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır. DPPH $\cdot$, kararlı bir diamanyetik molekül olmak için bir elektron veya hidrojen radikalini kolayca kabul eden bir serbest radikaldir. Kısa bir süre içinde çok sayıda numuneyi barındırabilir ve aktif ilkelerin düşük konsantrasyonlarını tespit edecek kadar hassastır (Floegel ve ark., 2011).

Bu çalışmada, stabil DPPH $\cdot$ ve ABTS $\cdot$ ile ölçülen H-verici yetenekleri açısından test edilen özüt numunesi, bitki özünde bir antiradikal aktivite gösterdi. Bunun nedeni, muhtemelen daha büyük antioksidan aktiviteye katkıda bulunan Phosphomolibdat yöntemiyle elde edilen ekstrakttaki daha yüksek polifenol içeriğinin varlığı olabilir. Stevia etanolik özütü flavonoidler, diterpenler, triterpenler, stigmasterol, tanenler ve uçucu yağ gibi fitokimyasallarda bulunabilir. Stevia'nın tatlılığından sorumlu bileşenler 1931'de belgelenmiştir bunlar; Stevioside, Dulcoside ve Rebaudioside gibi diterpenik glikozitlerdir.

Stevia rebaudiana'nın *in vitro* rejenere dokularının DPPH temizleyici antioksidan potansiyeli, (Ahmad ve ark., 2011) *Stevia rebaudiana* kallusunun yüksek (%87.7) DPPH radikal aktivitesi sergilediğini ortaya çıkarmışlardır.

Stevia özütü, alanin, asparagin, lösin ve prolin gibi antioksidan kapasite sergileyen bazı amino asitleri daha yüksek seviyelerde içeren ikincil metabolitler olarak sadece fenollere ve flavonoidlere ulaşmakla kalmaz ayrıca Stevia özütü, oldukça metillenmiş pektin sınıfının polisakkarit bileşenlerini içerir, bu nedenle antioksidan sonuçlarımız ya sadece stevia özünden ve formüle edilmiş kremlerden elde edilir. Ve aynı özütlerde sinerjistik olarak işlev görebilen farklı antioksidan moleküllerin ilişkisini gösterir (Periche ve ark., 2013); (Periche ve ark., 2015).

Antioksidanların serbest radikallere karşı etkinliğini sağlamak için, antioksidanlar çok kararsız olduğundan ve kolayca oksitlenebildiğinden, etki alanına ulaşmadan inaktif hale geldiğinden, nihai formülasyonu stabilize etmek önemlidir. %2 Stevia özü (F3) içeren formüle edilmiş kremin üç zaman aralığında (Tablo 3 ve Tablo 4). Stevia özü (F3) içeren formüle edilmiş krem, üç zaman aralığının tamamında antioksidan aktivite sergiledi. Bununla birlikte formülasyonun antioksidan etkisindeki değişiklik zaman içinde önemli değildir. Bu, Stevia ekstraktının aktif bileşenlerinin zaman içinde formüldeki diğer krem bileşenleri ile birleştiğinde stabil olduğu anlamına gelir.

Sonuçlar, Stevia'nın kozmetik ürünlerde stabil bir doğal antioksidan olarak kullanım için önemli bir potansiyele sahip olduğunu açıkça göstermiştir.

İnsan deri, saç ve göz pigmentasyonunda başlıca sorumlu olan ana pigment olan melaninler, melanogenez yoluyla melanositler tarafından üretilir. Melanogenez ve cilt pigmentasyonu güneşten ve cilt foto-karsinogenezinden veren ultraviyole için yanıt olarak en önemli fotokoruyucu faktördür. Anormal melanin kaybı ve depigmentasyon insanlar arasında ciddi bir yüz estetiği ve dermatolojik problem olabilir. Tirozinaz, farklı organizmalarda melanogenez ve enzimatik esmerleşmeden sorumlu olan çok-bakırlı bir enzimdir, bu nedenle tirozinaz inhibitörleri, esmerleşme önleyici bileşikler olarak kozmetikte çekici olabilir. Bu amaçla bugüne kadar farklı tarama yöntemleri ile birçok doğal, yarı sentetik ve sentetik inhibitör geliştirilmiştir. Bununla birlikte tıpta, tirozinaz inhibitörleri önemli klinik anti-melanom ilaçlarının bir sınıfıdır. Ancak sadece birkaç bileşiğin etkili ve güvenli tirozinaz inhibitörleri olarak hizmet ettiği bilinmektedir (Niu ve Aisa, 2017).

Çalışmamızda tirozinaz aktivitesi *in vitro* enzimatik-spektrofotometrik yöntem kullanılarak araştırıldı. Melanin sentez yolunun iki ardışık reaksiyonunda yer alır; ilki bir monofenolün hidroksilasyonu ve ikincisi bir orto-difenolün bir kinona dönüştürülmesidir.

Kinon daha sonra melanin oluşturmak için polimerizasyon dahil bir dizi reaksiyona girer. Tirozinaz, fenolik bir substratın, A510 nm'de absorbands ile oldua stabil bir kromofor oluşturan tirozin arttırıcı ile reaksiyona giren bir Quinone (kinon) ara ürününe dönüşümünü katalize eder (Zolghadri ve ark., 2019).

O-dopakinon süpürücüler ve denatranlar gibi farklı bileşik türleri arasında, sadece spesifik tirozinaz inaktivatrleri ve tersinir inhibitörler, enzime gerçek inhibitörler olarak bağlanır ve onun aktivitesini gerçekten inhibe eder. Genel olarak, "gerçek inhibitörler" tarafından engelleme modu şu dört türden biridir: rekabetçi, rekabetçi olmayan, karışık tip (rekabetçi/rekabetsiz) ve rekabetçi olmayan. Rekabetçi bir inhibitör, serbest bir enzime bağlanabilir ve enzimin aktif bölgesine substrat bağlanmasını önleyebilir. Tirozinazın bir metalloenzim olması özelliği ile ilgili olarak, birçok aromatik asit, fenolik ve poli-fenolik bileşik, birkaç aromatik olmayan bileşik gibi bakır şelatlayıcılar, tirozinaz substratını taklit ederek tirozinazı rekabetçi bir şekilde inhibe edebilir (Sun ve ark., 2014).

Bitkiler, bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere doğal kaynaklar son zamanlarda biyoaktif bileşikler üreterek anti tirozinaz aktiviteleri için artan bir ilgi haline gelmiştir. Bazı araştırmacılar, özellikle gıda, kozmetik ve tıbbi uygulamalar için daha az toksisite ve daha iyi biyoyararlanımları nedeniyle doğal kaynaklardan inhibitörleri tanımlamayı tercih etmektedir (X. wei Zhang ve ark., 2021).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Stevia'nın etanolik yaprak özütü, çalışılan tüm yöntemlerde antioksidan aktivite sergilemiştir. DPPH testinde 94.3 ± 1.12 ila 96.00 ± 1.13 mg/ml arasında değişen IC_{50} değerleri ile ve ABTS testinde 74.01 ± 2.0113 mg/ml idi. F3, kontrol C vitamini ve Baz Krem ile karşılaştırıldığında güçlü antioksidan aktivite göstermesine karşın Baz krem antioksidan aktivite göstermedi. Ama yaptığımız enzim çalışması sonucunda da tirozinaz inhibe edici etki sergiledi.

Bu çalışmada, Stevia etanolik özütünün tirozinaza karşı inhibitör aktivitesini onayladık, tirozin gibi monofenolik bir substrat kullandık.

Bulgularımıza göre *Stevia rebaudiana* özütünün tek başına ve ayrıca formüle edilmiş kremin içinde tirozinaz enzimini inhibe ettiğini göstermektedir. Bu nedenle, bu bitki özleri umut verici beyazlatma etkisine ve cilt faydalarına sahiptir.

Son olarak ise kozmetik/kozmesötik ürünlerde aktif içerik olarak kullanım potansiyeline sahiptir.

7. KAYNAKLAR

- Agidew, M. G. (2022). Phytochemical analysis of some selected traditional medicinal plants in Ethiopia. *Bulletin of the National Research Centre* 2022 46:1, 46(1), 1–22.
<https://doi.org/10.1186/S42269-022-00770-8>
- Ahmad, N., Fazal, H., Haider Abbasi, B., Anwar, S., Ali Khan, M., Basir, A., Inayat, H., Zameer, R., Akbar Khalil, S., & Yasmin Khan, K. (2011). DPPH-scavenging antioxidant potential in regenerated tissues of *Stevia rebaudiana*, *Citrus sinensis* and *Saccharum officinarum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14), 3293–3297.
<http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Ahsanuddin, S., Lam, M., Baron, E. D., Ahsanuddin, S., Lam, M., & Baron, E. D. (2016). Skin aging and oxidative stress. *AIMS Molecular Science* 2:187, 3(2), 187–195.
<https://doi.org/10.3934/MOLSCI.2016.2.187>
- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2019). Natural antioxidants of plant origin. *Advances in Food and Nutrition Research*, 90, 1–81. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2019.02.011>
- Ando, H., Matsui, M. S., & Ichihashi, M. (2010). Quasi-Drugs Developed in Japan for the Prevention or Treatment of Hyperpigmentary Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2566. <https://doi.org/10.3390/IJMS11062566>
- Arumugam, B., Subramaniam, A., & Alagaraj, P. (2020). Stevia as a Natural Sweetener: A Review. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 18(2), 94–103.
<https://doi.org/10.2174/1871525718666200207105436>
- Ashwell, M. (2015). Stevia, Nature's Zero-Calorie Sustainable Sweetener: A New Player in the Fight Against Obesity. *Nutrition Today*, 50(3), 129.
<https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000094>
- Babior, B. M. (1997). Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(2), 141–155. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1997000200001>
- Bae-Harboe, Y. S. C., & Park, H. Y. (2012). Tyrosinase: A Central Regulatory Protein for Cutaneous Pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 2678–2680.
<https://doi.org/10.1038/JID.2012.324>
- Baek, J., & Lee, M. G. (2016). Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 21(4), 164.
<https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000015>
- Bocheva, G., Slominski, R. M., & Slominski, A. T. (2019). Neuroendocrine Aspects of Skin Aging. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 2798, 20(11), 2798. <https://doi.org/10.3390/IJMS20112798>
- Boonsiripiphat, K., & Theerakulkait, C. (2009). Extraction of rice bran extract and some factors affecting its inhibition of polyphenol oxidase activity and browning in potato. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 39(2), 147–158.
<https://doi.org/10.1080/10826060902800817>
- Bujak, T., Zagórska-dziok, M., Ziemiańska, A., Nizioł-Łukaszewska, Z., Wasilewski, T., & Hordyjewicz-Baran, Z. (2021). Antioxidant and Cytoprotective Properties of Plant Extract from Dry Flowers as Functional Dyes for Cosmetic Products. *Molecules*, 26(9).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092809>

- Carrera-Lanestosa, A., Moguel-Ordóñez, Y., & Segura-Campos, M. (2017). Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *Journal of Medicinal Food*, 20(10), 933.
<https://doi.org/10.1089/JMF.2016.0171>
- Chaudhary, M., Khan, A., & Gupta, M. (2020). Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Current Aging Science*, 13(1), 22.
<https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115>
- Costin, G.-E., & Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal*, 21(4), 976–994.
<https://doi.org/10.1096/FJ.06-6649REV>
- Cui, H. X., Duan, F. F., Jia, S. S., Cheng, F. R., & Yuan, K. (2018). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of seed oils from *torreya grandis* Fort. ex Lindl. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5314320>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2(DEC), 53. <https://doi.org/10.3389/FENV.2014.00053/BIBTEX>
- Dyduch-Siemńska, M., Najda, A., Gawroński, J., Balant, S., Świca, K., & Żaba, A. (2020). Stevia Rebaudiana Bertoni, a Source of High-Potency Natural Sweetener—Biochemical and Genetic Characterization. *Molecules*, 25(4).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25040767>
- Ebanks, J. P., Wickett, R. R., & Boissy, R. E. (2009). Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 4066. <https://doi.org/10.3390/IJMS10094066>
- Faccio, G. (2020). Plant Complexity and Cosmetic Innovation. *IScience*, 23(8), 101358.
<https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101358>
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2013). Characteristics of the Aging Skin. *Advances in Wound Care*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2011.0356>
- Farhat, G., Berset, V., & Moore, L. (2019). Effects of Stevia Extract on Postprandial Glucose Response, Satiety and Energy Intake: A Three-Arm Crossover Trial. *Nutrients*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/NU11123036>
- Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K., Caroline, S., Mohamed, C., & Pierre, D. (2015). Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 74, 722–730.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.04.038>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048.
<https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2011.01.008>
- Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (n.d.). Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*, 4, 308–319.
<https://doi.org/10.4161/derm.22804>

- George, S., & Abrahamse, H. (2020). Redox Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. *Antioxidants*, 9(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9111156>
- Geuns, J. M. C. (2003). Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5), 913–921. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00426-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00426-6)
- Gomes, E. N., Moterle, D., Biasi, L. A., Koehler, H. S., Kanis, L. A., & Deschamps, C. (2018). Plant densities and harvesting times on productive and physiological aspects of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southern Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(4), 3249–3264. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170510>
- Graghani, A., Cornick, S. mac, Chominski, V., Noronha, S. M. R. de, Noronha, S. A. A. C. de, Ferreira, L. M., Gragnani, A., Cornick, S. mac, Chominski, V., Noronha, S. M. R. de, Noronha, S. A. A. C. de, & Ferreira, L. M. (2014). Review of Major Theories of Skin Aging. *Advances in Aging Research*, 3(4), 265–284. <https://doi.org/10.4236/AAR.2014.34036>
- Hęś, M., Dziedzic, K., Górecka, D., Jędrusek-Golińska, A., & Gujska, E. (2019). Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 74(3), 255. <https://doi.org/10.1007/S11130-019-00747-5>
- Jahangir Chughtai, M. F., Pasha, I., Zahoor, T., Khaliq, A., Ahsan, S., Wu, Z., Nadeem, M., Mehmood, T., Amir, R. M., Yasmin, I., Liaqat, A., & Tanweer, S. (2020). Nutritional and therapeutic perspectives of *Stevia rebaudiana* as emerging sweetener; a way forward for sweetener industry. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tcyt*, 18(1), 164–177. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1721562>
- Jan, S. A., Habib, N., Shinwari, Z. K., Ali, M., & Ali, N. (2021). The anti-diabetic activities of natural sweetener plant *Stevia*: an updated review. *SN Applied Sciences*, 3(4), 1–6. <https://doi.org/10.1007/S42452-021-04519-2/TABLES/2>
- Kim, M., & Park, H. J. (2016). Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation. *Molecular Mechanisms of the Aging Process and Rejuvenation*. <https://doi.org/10.5772/62983>
- Koch, W., Zagórska, J., Marzec, Z., & Kukula-Koch, W. (2019). Applications of Tea (*Camellia sinensis*) and Its Active Constituents in Cosmetics. *Molecules*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234277>
- Krutmann, J., Bouloc, A., Sore, G., Bernard, B. A., & Passeron, T. (2017). The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science*, 85(3), 152–161. <https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2016.09.015>
- Lam, Y. T. (2016). Critical roles of reactive oxygen species in age-related impairment in ischemia-induced neovascularization by regulating stem and progenitor cell function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7095901>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luceri, C., Bigagli, E., Femia, A. pietro, Caderni, G., Giovannelli, L., & Lodovici, M. (2018). Aging related changes in circulating reactive oxygen species (ROS) and protein carbonyls are indicative of liver oxidative injury. *Toxicology Reports*, 5, 141–145. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2017.12.017>

- Mesa-Arango, A. C., Flórez-Muñoz, S. V., Sanclemente, G., Mesa-Arango, A. C., Flórez-Muñoz, S. V., & Sanclemente, G. (2017a). Mechanisms of skin aging. *Iatreia*, 30(2), 160–170. <https://doi.org/10.17533/UDEA.IATREIA.V30N2A05>
- Mesa-Arango, A. C., Flórez-Muñoz, S. V., Sanclemente, G., Mesa-Arango, A. C., Flórez-Muñoz, S. V., & Sanclemente, G. (2017b). Mechanisms of skin aging. *Iatreia*, 30(2), 160–170. <https://doi.org/10.17533/UDEA.IATREIA.V30N2A05>
- Michalak, M. (2022). Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS23020585>
- Mlambo, R., Wang, J., & Chen, C. (2022). Stevia rebaudiana, a Versatile Food Ingredient: The Chemical Composition and Medicinal Properties. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/3573005>
- Nadeeshani Dilhara Gamage, D. G., Dharmadasa, R. M., Chandana Abeysinghe, D., Saman Wijesekara, R. G., Prathapasinghe, G. A., & Someya, T. (2022). Global Perspective of Plant-Based Cosmetic Industry and Possible Contribution of Sri Lanka to the Development of Herbal Cosmetics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9940548>
- Nagarani, G., Abirami, A., & Siddhuraju, P. (2014). A comparative study on antioxidant potentials, inhibitory activities against key enzymes related to metabolic syndrome, and anti-inflammatory activity of leaf extract from different Momordica species. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 36–46. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2014.02.003>
- Nanzadsuren, T., Myatav, T., Dorjkhoo, A., Ganbat, M., Batbold, C., Batsuuri, B., & Byamba, K. (2022). Skin aging risk factors: A nationwide population study in Mongolia risk factors of skin aging. *PLOS ONE*, 17(1), e0249506. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0249506>
- Niu, C., & Aisa, H. A. (2017). Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22081303>
- Ortonne, J. P. (2012). Normal and abnormal skin color. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 139 Suppl 4. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(12\)70123-0](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(12)70123-0)
- Ortuño-Sahagún, D., Pallàs, M., & Rojas-Mayorquín, A. E. (2014). Oxidative stress in aging: Advances in proteomic approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/573208>
- Pasquel, A., Meireles, M. A. A., Marques, M. O. M., & Petenate, A. J. (2000). Extraction of stevia glycosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol, and CO₂ + water + ethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17(3), 271–282. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322000000300003>
- Periche, A., Koutsidis, G., & Escriche, I. (2013). Composition of Antioxidants and Amino Acids in Stevia Leaf Infusions. *Plant Foods for Human Nutrition* 2013 69:1, 69(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S11130-013-0398-1>
- Peteliuk, V., Rybchuk, L., Bayliak, M., Storey, K. B., & Lushchak, O. (2021). Natural sweetener Stevia rebaudiana: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI Journal*, 20, 1412. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2021-4211>

- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4019>
- Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2009). Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1038/JIDSYP.2009.8>
- Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(8), 2388–2395. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2014.02.048>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribeiro, A. S., Estanqueiro, M., Oliveira, M. B., & Lobo, J. M. S. (2015). Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics 2015, Vol. 2, Pages 48-65*, 2(2), 48–65. <https://doi.org/10.3390/COSMETICS2020048>
- Santos, A. L., Sinha, S., & Lindner, A. B. (2018). The good, the bad, and the ugly of ROS: New insights on aging and aging-related diseases from eukaryotic and prokaryotic model organisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1941285>
- Shao, Y., He, T., Fisher, G. J., Voorhees, J. J., & Quan, T. (2017). Molecular basis of retinol anti-aging properties in naturally aged human skin in vivo. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(1), 56. <https://doi.org/10.1111/ICS.12348>
- Si, H., & Liu, D. (2014). Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(6), 581. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2014.02.001>
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835. <https://doi.org/10.1016/J.JOPR.2013.10.001>
- Souza, P. M., Elias, S. T., Simeoni, L. A., de Paula, J. E., Gomes, S. M., Guerra, E. N. S., Fonseca, Y. M., Silva, E. C., Silveira, D., & Magalhães, P. O. (2012). Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. *PLOS ONE*, 7(11), e48589. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048589>
- Sun, W., Wendt, M., Klebe, G., & Röhm, K. H. (2014). On the interpretation of tyrosinase inhibition kinetics. <http://Dx.Doi.Org/10.3109/14756366.2012.755621>, 29(1), 92–99. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.755621>
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2006.03.050>
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., & Hearing, V. J. (2007). The Regulation of Skin Pigmentation *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27557–27561. <https://doi.org/10.1074/JBC.R700026200>

- Youssef, M. A., Yousef, A. F., Ali, M. M., Ahmed, A. I., Lamlom, S. F., Strobel, W. R., & Kalaji, H. M. (2021). Exogenously applied nitrogenous fertilizers and effective microorganisms improve plant growth of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and soil fertility. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13568-021-01292-8>
- Zagórska-Dziok, M., Ziemlewska, A., Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., & Hordyjewicz-Baran, Z. (2021). Cosmetic and Dermatological Properties of Selected Ayurvedic Plant Extracts. *Molecules*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26030614>
- Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplantation*, 27(5), 729. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>
- Zhang, X. wei, Bian, G. li, Kang, P. ying, Cheng, X. jie, Yan, K., Liu, Y. li, Gao, Y. xia, & Li, D. qiang. (2021). Recent advance in the discovery of tyrosinase inhibitors from natural sources via separation methods. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 2104. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1983559>
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Https://Doi.Org/10.1080/14756366.2018.1545767*, 34(1), 279–309. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>