

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

EKOLOJİK SOLVENT DESTEKLİ PROPOLİS EKSTRAKTLARININ
HAZIRLANMASI VE ENKAPSÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Pelin KILIÇARSLAN

NİSAN 2025

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

EKOLOJİK SOLVENT DESTEKLİ PROPOLİS EKSTRAKTLARININ
HAZIRLANMASI VE ENKAPSÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Pelin KILIÇARSLAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 /03 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 16 /04 / 2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 5220104 no'lu projeden sağlanmıştır. “Ekolojik solvent destekli propolis ekstraktlarının hazırlanması ve enkapsüllerinin geliştirilmesi” isimli bu tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Doktora Programı’nda hazırlandı.

Tez çalışmam boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ve bilim insanı olma yolundaki ilk adımlarımı atarken kıymetli bilgileriyle ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması sürecinde bana desteklerini esirgemeyen Kimya Bölümü’ndeki tüm değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, doğduğum günden beri elimi hiç bırakmayan, hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her kararında arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan annem Birgül BİRİNCİ ve babam Mehmet BİRİNCİ’ye, kardeşim Ahmet BİRİNCİ’ye ve lisans hayatımdan beri hep yanımda olan ve beni her daim destekleyen eşim Mehmet KILIÇARSLAN ve minik oğlumuz Atlas KILIÇARSLAN’a teşekkür eder, minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışmasının bundan sonraki çalışmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

Pelin KILIÇARSLAN

Trabzon, 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Ekolojik solvent destekli propolis ekstraktlarının hazırlanması ve enkapsüllerinin geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 16/04/2025

Pelin KILIÇARSLAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Amaç ve Hedefler.....	4
1.3. Yeşil Teknoloji ve Çözücüler.....	4
1.4. Derin Ötektik Solventler	7
1.5. Propolis.....	9
1.6. Polifenoller	12
1.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	18
1.8. Ekstraksiyon	19
1.9. Enkapsülasyon.....	20
1.10. Enkapsülasyon Yöntemleri.....	20
1.10.1. Püskürterek Kurutma	21
1.10.2. Koaservasyon Yöntemi	22
1.10.3. Emülsiyon Oluşturma	23
1.10.4. Dondurarak Kurutma Yöntemi	24
1.10.5. İyonik Jelasyon Yöntemi	24
1.11. Enkapsülasyon Kullanılan Kaplama Materyalleri.....	26
1.11.1. Pektin	26
1.12. <i>in vitro</i> Gastrointestinal Sistem	27
1.13. Antioksidanlar	28
1.14. Antioksidan Tayin Yöntemi	28
1.14.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini	29

1.14.2. Demir İndirgeme / Antioksidan Güç-FRAP	29
1.14.3. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi.....	30
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	31
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	31
2.2. Kimyasal Maddeler	31
2.3. Kullanılan Çözeltiler	33
2.4. Çalışılan Numunelerin Temin Edilmesi ve Saklanması.....	36
2.5. Etanolik Propolis Özütlerinin Hazırlanması.....	36
2.6. Sulu Propolis Özütünün Hazırlanması	37
2.7. Derin Ötektik Solventlerin (DÖS) Hazırlanması	37
2.8. Propolisin Sulu Ortamdaki Alkali Ekstraksiyonu	39
2.9. Propolisin Bitkisel Yağlar ile Ekstraksiyonu	39
2.10. Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....	40
2.10.1. Toplam Fenolik Madde Tayini (TFM).....	40
2.10.2. Toplam Flavonoid Madde Tayini	41
2.10.3. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini	42
2.10.4. DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analizi.....	43
2.11. HPLC-PDA ile Fenolik İçeriğin Belirlenmesi	43
2.11.1. RP-HPLC-PDA Analiz koşulları	43
2.11.2 Validasyon ve Kalibrasyon	44
2.12. Enkapsülasyon Çalışmaları	44
2.12.1. Propolis-Pektin Kapsüllerinin Hazırlanması.....	44
2.12.2. Pektin Konsantrasyonunun Etkisi	45
2.12.3. Enkapsülasyonda Carr İndeksi.....	45
2.12.4. Enkapsüle Toz Örneklerinin Partikül Analizi.....	46
2.12.5. Propolis-Pektin kapsüllerinin <i>in vitro</i> Gastrointestinal Sindirimi.....	46
3. BULGULAR.....	48
3.1. Ekstraktların Hazırlanması	48
3.2. Antioksidan Analiz Sonuçları	48
3.2.1. Standart Çalışma Grafiği.....	48
3.2.2. Derin Ötektik Solvent Çalışmaları	49
3.2.3. DÖS Çalışmaları	49
3.2.4. Alkali Çözünürleştirme	51
3.2.5. Bitkisel Yağlardaki Propolis Özütleri	52

3.2.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analiz Sonuçları	54
3.2.7. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Analiz Sonuçları.....	55
3.2.8. DPPH Radikal Temizleme Aktivite Analiz Sonuçları	57
3.3. RP-HPLC-PDA ile Yapılan Fenolik Bileşen Analizleri	57
3.4. Enkapsülasyon Çalışmaları	62
3.4.1. İyonik Jelasyon Yöntemi ile Kapsülasyon Oluşumu	62
3.4.2. Pektin-Propolis Kapsüllerinin Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Enkapsülasyon Etkinliği	63
3.4.3. Dondurarak Kurutma ve Püskürterek Kurutma ile Enkapsülasyon Çalışmaları	64
3.4.4. Püskürterek ve Dondurarak Kurutma İşlem Koşullarının Belirlenmesi	65
3.4.5. Püskürterek ve Dondurarak Kurutma ile Elde Edilen Kapsüllerin Enkapsülasyon Etkinlikleri	66
3.4.6. Enkapsüle Ürünlerin Karakteristik Özellikleri	68
3.4.7. Enkapsüle Örneklerinin Partikül Analizi	70
3.5. Kapsüllerde <i>in vitro</i> Gastrointestinal Sistem	73
3.5.1. Kapsüllerin RP-HPLC-PDA Fenolik Analizi	74
3.5.2. SEM Görüntüleri	78
4. TARTIŞMA	80
5. SONUÇLAR	90
6. ÖNERİLER	91
7. KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

EKOLOJİK SOLVENT DESTEKLİ PROPOLİS EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI VE ENKAPSÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Pelin KILIÇARSLAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2025, 104 Sayfa

Propolis, bal arıları kovanından toplanan reçinemsî bir yapıya sahip doğal bir karışımdır. Çok geniş biyolojik aktif özelliğinden dolayı önemli doğal takviye edici üründür. Ham propolis, arı kovanlarından toplandıktan sonra propolis özütleri veya kapsülleri halinde tüketilir. Etanol bilinen en ideal propolis solventi olmasına rağmen, artık çevre dostu propolis özüt ve kapsülleri son zamanlarda daha ilgi görmektedir. Doktora tezi olarak planlanan bu çalışmada ham propolis ekolojik özütler ve kapsüller geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla derin ötektik solvent karışımları (kolin klorür, laktik asit, sitrik asit, askorbik asit, prolin gibi), bitkisel yağlar (ayçiçek, fındık, zeytinyağı, susam yağı vb.) ve su bazlı bazik çözünürleştirme sistemleri ile özütlemeler yapılarak en yüksek özütleme kapasitesine sahip çözücü sistemleri belirlenmeye çalışıldı. Etanolik Anadolu propolisi, pektin ve inülin polimerlerine karşın püskürtmeli kurutma, dondurma kurutma ve iyonik jelasyon teknikleri uygulanarak enkapsülasyon çalışmaları yapıldı. Propolisin özütleme ve kapsüllenme kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı (TPC), toplam flavonoid madde miktarı (TFC), antioksidan kapasite testleri (FRAP ve DPPH) ile RP-HPLC-PDA ile fenolik bileşen analizleri ile ölçüldü. En iyi derin ötektik karışımının kolin klorür-laktik asit (1:10) olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Derin ötektik solvent, Kapsülasyon, Kolin klorür

PhD. Thesis

SUMMARY

PREPARATION OF ECOLOGICAL SOLVENT-SUPPORTED PROPOLIS EXTRACTS AND DEVELOPMENT OF ENCAPSULES

Pelin KILIÇARSLAN

Karadeniz Technical University
Institute of Science and Technology
Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI
2025, 104 Pages

Propolis is a natural mixture with a resinous structure collected from honey bee hives. It is an important natural supplement product due to its wide range of biologically active properties. Raw propolis is consumed in the form of propolis extracts or capsules after being collected from beehives. Although ethanol is the most ideal propolis solvent known, environmentally friendly propolis extracts and capsules have recently attracted more attention. In this study planned as a doctoral thesis, it was aimed to develop raw propolis ecological extracts and capsules. For this purpose, extractions were made with deep eutectic solvent mixtures (choline chloride, lactic acid, citric acid, ascorbic acid, proline, etc.), vegetable oils (sunflower, hazelnut, olive oil, sesame oil, etc.) and water-based basic solubilization systems, and the solvent systems with the highest extraction capacity were tried to be determined. Encapsulation studies were carried out by applying spray drying, freeze drying and ionic gelation techniques against ethanolic Anatolian propolis pectin and inulin polymers. Extraction and encapsulation capacity of propolis was measured by total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), antioxidant capacity tests (FRAP and DPPH) and phenolic component analysis by RP-HPLC-PDA. The best deep eutectic mixture was determined to be choline chloride-lactic acid (1:10).

Key Words: Propolis, Deep eutectic solvent, Capsulation, Choline chloride

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Yaygın olan yeşil çözücüler.....	6
Şekil 2. Ham Propolis	10
Şekil 3. Polifenollerin sınıflandırılması	13
Şekil 4. Flavonoidlerin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 5. Flavonoidlerin temel iskelet yapısı ve sınıfları.....	14
Şekil 6. HPLC cihazının şematik görüntüsü	18
Şekil 7. Püskürterek kurutma yönteminin şematize hali.....	21
Şekil 8. Koaservasyon yöntemi.....	22
Şekil 9. Emülsiyon oluşturma yöntemi.....	23
Şekil 10. Kalsiyum-aljinat bağlanma mekanizması.....	25
Şekil 11. İyonik jelasyon yöntemi	26
Şekil 12. Stok etanolik propolis ekstraktı	36
Şekil 13. Hazırlanan derin ötektik solventler.....	38
Şekil 14. Propolis-sodyum karbonat ekstraksiyonları	39
Şekil 15. Döner buharlaştırıcıda organik çözücünden uzaklaşan yağ-propolis ekstraktı.....	40
Şekil 16. Pektinle iyonik jelasyon.....	45
Şekil 17. <i>in vitro</i> sindirim modeli akış şeması	47
Şekil 18. Gallik asit standart kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 19. Kuersetin standart kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 20. FeSO ₄ .7H ₂ O standart kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 21. Propolis-pektin kapsülleri.....	62
Şekil 22. Kurutulmuş pektin-propolis kapsülleri ve toz hali	63
Şekil 23. Propolis enkapsülasyon şematik gösterimi	65
Şekil 24. Propolis enkapsülasyon yöntemleri	66
Şekil 25. Enkapsüle toz örneklerinin görüntüsü	67
Şekil 26. Pektin-iyonik jelasyon ile elde edilen enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği	70
Şekil 27. Pektin-püskürterek kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği	71

Şekil 28.	İnülin-püskürterek kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği.....	71
Şekil 29.	Pektin-dondurarak kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği.....	72
Şekil 30.	İnülin-dondurarak kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği.....	72
Şekil 31.	İyonik jelasyon ile yapılan propolis-pektin kapsüllerinin SEM görüntüleri.....	79



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı fenolik bileşen örnekleri	16
Tablo 2. Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri	17
Tablo 3. Sindirim sistemindeki bölgeler ve pH değerleri	27
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka/model bilgileri	32
Tablo 5. Kullanılan kimyasalların isimleri ve bilgileri	32
Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	33
Tablo 7. Toplam fenolik madde analiz metodu	41
Tablo 8. Toplam flavonoid madde tayini metodu	42
Tablo 9. Demir (III) indirgeme antioksidan güç-FRAP tayini	42
Tablo 10. DPPH• radikal temizleme aktivitesi tayini	43
Tablo 11. Referans propolis+kolin klorür-laktik asit konsantrasyonlarıyla toplam fenolik madde analizi karşılaştırılması	50
Tablo 12. Propolis+kolin klorür-sitrik asit çözeltisinin toplam fenolik madde miktarı.....	50
Tablo 13. Propolis+kolin klorür-prolin çözeltisi toplam fenolik madde miktarı.....	51
Tablo 14. Propolisin alkali ortamdaki toplam fenolik madde miktarı	51
Tablo 15. Na ₂ CO ₃ içeren çözeltilerin yenilebilir pH için gerekli askorbik asit miktarı.....	52
Tablo 16. Propolis-yağ karışımlarındaki toplam fenolik madde miktarı	53
Tablo 17. Propolis ve fındık yağı ile yapılan özütlemelerin toplam fenolik madde miktarı.....	53
Tablo 18. Özütlerdeki toplam flavonoid madde miktarı.....	55
Tablo 19. Ekstraktlardaki demir (III) indirgeme antioksidan güç-FRAP analiz sonuçları.....	56
Tablo 20. Ekstraktlardaki DPPH aktivite değerleri	57
Tablo 21. Standartlar için RP-HPLC-PDA sistemindeki kalibrasyon bilgileri	58
Tablo 22. RP-HPLC-PDA fenolik analiz sonuçları	59
Tablo 23. Fındık yağı+lesitin+propolis ekstraktlarının fenolik analizi	60
Tablo 24. Propolis+ 1:10 kolin klorür-laktik asit örneğinin hplc fenolik profili	61
Tablo 25. Propolis-pektin kapsüllerinin toplam fenolik madde analiz sonuçları	64
Tablo 26. İyonik jelasyon ile elde edilen kapsüllerinin enkapsülasyon etkinliği	64

Tablo 27. Püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği.....	67
Tablo 28. Enkapsüle toz örneklerin nem miktarı, a_w değerleri, kurutma verimi ve çözünürlük analiz sonuçları	69
Tablo 29. Enkapsüle toz örneklerin partikül analiz sonuçları.....	70
Tablo 30. Kapsüllerin biyoyararlılık değerleri.....	73
Tablo 31. Kapsüllerin RP-HPLC-DAD ile ölçülen fenolik bileşenleri	74
Tablo 32. İyonik jelasyonla elde edilen pektinli kapsüllerin RP-HPLC-DAD analizleri	75
Tablo 33. Kapsüllerin sindirim sonrası fenolik analizleri.....	77



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

nm	: Nanometre
PDA	: Fotodiyot dizisi dedektör
DÖS	: Derin ötektik solvent
CAPE	: Kafeik asit fenil ester
DPPH•	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	: Ferrik indirgeyici antioksidan güç
TPC	:Toplam fenolik madde miktarı
TFC	: Toplam flavonoid madde miktarı
QE	: Kuersetin eşdeğeri
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
µm	: Mikrometre
M	: Molar
TPTZ	: 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ppm	: Milyonda bir birim
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
g	: gram
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
rpm	: Dakikada devir sayısı
CC	: Kolin klorür
LA:	: Laktik asit
R ²	: Determinasyon katsayısı
LOD	: Gözlenebilme sınır
LOQ	: Tayin sınırı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yeşil kimya, çevresel etkileri en aza indiren, tehlikeli maddelerin kullanımını azaltan süreçler ve ürünler geliştirmeye odaklanan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımın önemli bir yönü, geleneksel çözücülere alternatif olarak daha güvenli ve sürdürülebilir yeşil çözücülerin geliştirilmesidir. Yeşil çözücüler, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilen maddelerden tasarlanır. Bu sayede zararlı kimyasallara olan bağımlılığı azaltırken, çevreye verilen zararı da en aza indirir. Kimyasal süreçlerde yeşil çözücülerin kullanımı, çevresel ayak izini azaltarak daha sürdürülebilir ve çevre dostu üretim hedeflerine katkı sağlar (Paiva vd., 2014).

Yeşil kimyanın ana hedefi, tehlikeli zararlı maddelerin minimum kullanımı ve toksik atıkların minimum üretimi ile kimyasal ve kimyasal-teknolojik süreçler oluşturmaktır (Horvath ve Anastas, 2007). Biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için geleneksel (uçucu ve toksik) organik çözücüler yerine kullanılacak “yeşil” çözücülerin geliştirilmesi, tüketicilerin bitkisel ürünlere (ilaçlar, gıda takviyeleri, kozmetikler vb.) artan ilgisi nedeniyle önemlidir (Koul vd., 2018). Son zamanlarda, yeni bir tür “yeşil” solvent olan derin ötektik solventler (DÖS'ler) geliştirilmiştir. Bir DÖS, her bir bileşenin erime noktasından çok daha düşük bir erime noktasına sahip olan ve ortam sıcaklığında sıvı halde bulunan bir ötektik karışım oluşturan katı bileşiklerden oluşur (Namiesnil, 2014). Günümüzde sık kullanılan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonları, organik/su çözücü karışımlar, organik çözücüler (etanol, metanol, kloroform, vb.) katı-sıvı ekstraksiyonlara dayanmaktadır. Organik çözücüler; uçuculuk, toksisite, yanıcılık, yüksek maliyet gibi dezavantajlara sahip olduğu belirtilmiştir (Clarke vd., 2018). Yenilenemeyen kaynaklardan elde edilen ekstraksiyon çözücülerini hem çevreye hem insan sağlığına zararlı olduğundan şüphelenilen uçucu organik bileşiklerden olduğu bilinmektedir (Chemat vd., 2019). Yeşil ekstraksiyon, enerji tüketimini azaltacak alternatif çözücülerin yenilenebilir doğal ürünlerinin kullanımına izin verecek güvenli, yüksek kaliteli ürünler sağlayacak ekstraksiyon yöntemlerinin keşfine dayanmaktadır (Chemat vd., 2012).

Derin ötektik solventler, benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip günümüzde kullanılan organik çözücülere bir alternatif olarak, daha yüksek ekstraksiyon verimliliği

sağlamıştır (Mişan vd., 2020). Derin ötektik çözücüler genel olarak ikili karışımlardan oluşmaktadır; bileşenlerden biri hidrojen bağı alıcısı (HBA), diğeri ise bir hidrojen bağı donörüdür (HBD). DÖS'lerin oluşumunda, bileşikler arasında kovalent bağ değil, hidrojen bağı oluşmaktadır. Ötektik oluşumu hidrojen bağı alıcısı ve hidrojen bağı vericisinin karşılıklı hidrojen bağlama yeteneklerine bağlıdır (Marcus, 2019).

Derin ötektik solventlerin ekstraksiyonunda hidrojen bağı alıcısı (HBA) esas olarak fosforyum tuzları veya kuaterner amonyum içerirken, en yaygın hidrojen bağı alıcısı (HBA) olarak alkoller, karboksilik asitler ve amidler kullanılmıştır. En yaygın derin ötektik çözücüler bir hidrojen bağı alıcısı (HBA) olarak kolin klorür, hidrojen bağı donörü (HBD) olarak ise karboksilik asitler ve diğer hidrojen bağı alıcılarını, örneğin; gliserol, sitrik asit, süksinik asit kullanılarak oluşmaktadır (Mbous vd., 2017; Paiva vd., 2014).

Kontrol dışı serbest radikal üretimi gerçekleşen alzheimer, kanser gibi hastalıklar dengesiz bir antioksidan mekanizması sonucu olarak daha yaygın hale gelmektedir (Ribeiro vd., 2020). Polifenolik bileşikler, mükemmel antiradikal özellikler gösteren fitokimyasallar grubudur. Anti-inflamatuvar, immünomodülatör, nöroprotektif, kardiyoprotektif, antiviral, anti-kanser ve antimikrobiyal gibi çok çeşitli farmakolojik aktiviteler sergiledikleri bulunmuştur. Ayrıca, polifenoller oksidatif bozulmayı ve mikrobiyal kontaminasyonu önleyen etkili doğal gıda koruyucularıdır (Oniszcuk vd., 2016). Oksidasyon, birçok farklı canlı organizma türünde enerji yaratılması için gerekli olan biyolojik bir süreçtir. Öte yandan, oksijen türevi serbest radikallerin kontrolsüz üretimi hücreler için zararlıdır. Buna ek olarak, başka serbest radikallerin üretimiyle sonuçlanacak zincirleme bir reaksiyon başlatma potansiyeline sahiptir. Serbest radikaller, proteinlerin karışmasına ve manipüle edilmesine yol açarak genetik materyale zarar vermenin yanı sıra serbest radikal kaynaklı hastalıklara ve yaşlanmaya neden olur. Oksidasyonun insanlar üzerindeki zararlı etkilerini azaltmak amacıyla günümüzde çok sayıda sentetik antioksidan yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yuan vd., 2008; Shi vd., 2013). Ayrıca, insan vücudunu serbest radikallerin neden olduğu hasardan korumak ve kanser, artrit ve kalp rahatsızlıkları da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıkların riskini azaltmak için doğal olarak oluşan güçlü antioksidanları keşfetmek ve kullanmak kesinlikle gereklidir (Moradi vd., 2022).

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından kovanda veya özel propolis tuzaklarında toplanan bitkisel kaynaklardan elde edilen reçine benzeri maddelerden üretilen doğal bir maddedir. Bal arıları propolisi izolasyon, antifungal ve antimikrobiyal ajan olarak kullanırlar (Kolaylı, 2024).

Propolis, B1 ve B2 vitaminleri başta olmak üzere B6, C ve E vitaminleri gibi önemli vitaminleri içerir. Ayrıca magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi mineraller bakımından da zengindir. Bununla birlikte, propolis içerisinde süksinik dehidrojenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi çeşitli enzimler de bulunmaktadır (Pasupuleti vd., 2017).

Propolis baldan sonra üçüncü önemli arı ürünüdür ve esas olarak reçineler (%50), balmumu (%30), uçucu yağlar (%10), polen (%5) ve diğer organik bileşiklerden (%5) oluşur (Kasote, 2017; Viuda-Martos vd., 2008; Fokt vd., 2010). Propolisin organik bileşenleri arasında fenolik bileşikler, esterler, flavonoidler, terpenler, beta-steroidler, aromatik aldehytler ve alkoller bulunmaktadır (Kapare & Sathiyarayanan, 2020; Kayaoglu vd., 2011). Propolis, başta pinosembrin, asasetin, krisin, rutin, luteolin, kemferol, apigenin, mirisetin, kateşin, naringenin, galangin ve kuersetin olmak üzere çeşitli flavonoidler içerir. Ayrıca kafeik asit ve sinamik asit gibi iki önemli fenolik asit de propolisin bileşenleri arasında yer almaktadır. (Dezmirean vd., 2021; Benhanifia ve Mohamed, 2015). Gıda zincirlerinin bir parçası olarak doğal olarak oluşan bileşikler, özellikle polifenoller ve vitaminler biyoaktif olarak kabul edilir (Sagar vd., 2018). Fenolik bileşikler, arı ürünlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuvar, antifungal, yara iyileştirici ve kardiyoprotektif aktivitelerinden sorumludur.

Modern bilim, antimikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuvar, immün sistemi uyarıcı, hepatoprotektif, sitotoksik vb. çeşitli farmakolojik aktivitelerini kanıtlamıştır. Propolisin, tek tek bileşenlerinin sinerjik etkisi nedeniyle doğal bir karışım olarak geniş spektrumlu bir farmakolojik değere sahip olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Propolisin biyoaktif bileşenleri kompleksinin ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan çözücü %70'lik etanoldür. Bununla birlikte, ekstraktlardaki alkol varlığı, bir dizi hastalıkta, küçük çocuklarda ve hamile kadınlarda kontrendikasyonları olduğu için propolis kullanımını sınırlar (Boryana vd., 2019). Bu tez çalışmasında, arı ürünlerinden biri olan propolisi etanole alternatif olarak biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için, organik çözücülere göre çevre dostu ve çözme kabiliyeti yüksek olan derin ötektik çözücüler ile propolis ekstraktları çalışıldı. Ayrıca propolis kapsülleri elde edildi.

1.2. Amaç ve Hedefler

Arı kovanlarından toplanan ham propolis; katı, yapışkan yapıda, yoğun aromatik kokulu, acı ve tatsız bir karışımdır. Bu haliyle doğrudan tüketime uygun değildir. Ancak uygun çözücülerle özütlenmesi sonucunda, propolis özütleri farklı formülasyonlarla (damla, kapsül, draje, tablet vb.) çeşitli amaçlarla tüketime uygun hale getirilebilmektedir. Şimdiye kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, ham propolisin özütlenmesi için en etkili çözücünün etanol olduğu belirlenmiştir. Özellikle gıda sınıfı etil alkol kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda, %65–80 oranındaki etanolün en yüksek çözünürlük sağladığı rapor edilmiştir (Kara vd., 2022; Kolaylı ve Birinci, 2024).

Bununla birlikte, etanol çevre dostu olmayan bir çözücü olarak sınıflandırılmakta ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Sağlıklı bireylerde etanol bazlı propolis özütlerinin tüketimi genellikle sorun yaratmamakla birlikte, özellikle karaciğer hastalığı bulunan bireyler için risk teşkil edebilir. Ayrıca, helal gıda kriterleri açısından da etanolden tamamen arındırılmış propolis özütlerine duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır.

Bu doktora tezinin temel amacı, tüketici beklentileri ve sağlık kriterleri doğrultusunda, alkolsüz propolis özütleri ve yüksek biyoyararlanıma sahip kapsül formülasyonları geliştirmektir. Bu kapsamda, su bazlı, bitkisel yağ bazlı ve çevre dostu yeşil çözücüler kullanılarak propolis özütleme çalışmaları gerçekleştirilecektir. Ayrıca, yenilebilir biyopolimerler ile formüle edilmiş, sindirilebilirliği yüksek propolis kapsüllerinin geliştirilmesi de projenin önemli hedefleri arasında yer almaktadır.

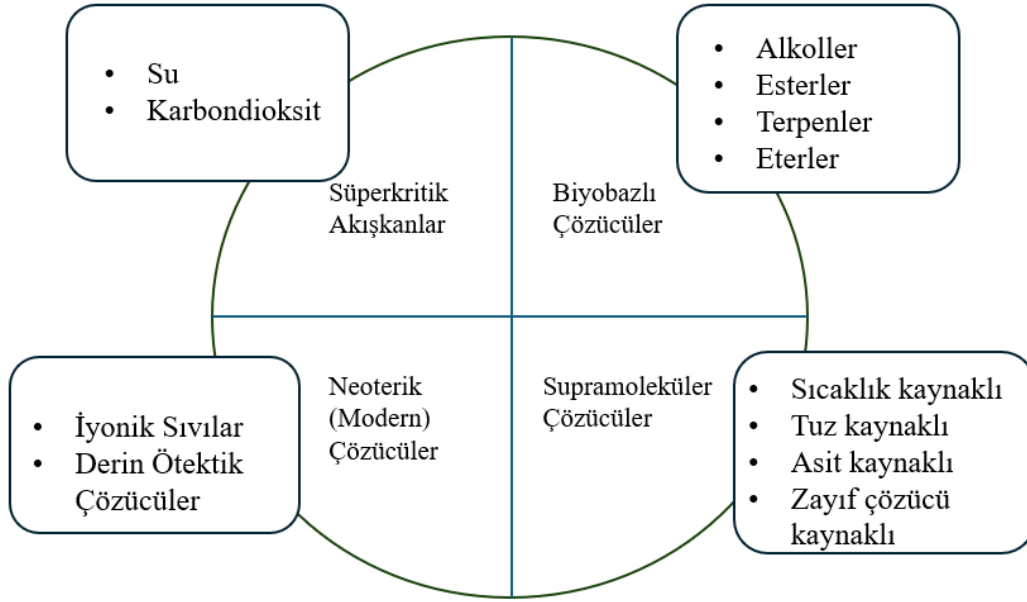
1.3. Yeşil Teknoloji ve Çözücüler

Yeşil teknoloji, ekosistemdeki kısa ve uzun vadeli etkilerle ilgili üretim proseslerini iyileştirmenin bir yoludur (Choi ve Verpoorte, 2019). Günümüzde yeşil teknoloji, çevreyi korumayı ve insan müdahalesinin olumsuz etkilerini azaltmayı amaçladığı için kimya alanındaki en önemli konulardan biridir. Yeşil teknoloji, tehlikeli olmayan ortamların minimum kullanımını, ortamın sıcaklık ve basınç gibi fiziksel özelliklerini kontrol ederek ve yeni yeşil çözücüler geliştirerek çevresel olarak kabul edilebilir yeni çözümler geliştirme tekniklerini kolaylaştırır. Yeşil teknolojinin çeşitli yolları arasında yeni yeşil çözücüler geliştirmek en önemli konulardan biri olabilir.

Yeşil çözücü ilkeleri, çeşit seçimi yoluyla inovasyonu ve yenilenebilir bitki kaynaklarının kullanımını içerir; bu da bol ve sürdürülebilir bitki çeşitlerinin seçilmesini vurgular (Morón-Ortiz vd., 2024). Yeşil ekstraksiyon, klorlu solventler veya benzen gibi toksik ve tehlikeli solventlere alternatif olarak su veya tarımsal solventler gibi alternatif solventlerin ve diğer biyo-bazlı solventlerin kullanımını teşvik eder. Bu bağlamda, mevcut sert organik çözücülerin yerini almak üzere sıvılar ve derin ötektik çözücülere büyük önem verilmektedir. Saf katı kimyasalların, iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücülerde olduğu gibi belirli oranlarda karıştırılarak sıvı hale gelebildiği iyi bilinen bir olgudur (Dai vd., 2013). İyonik sıvılar, düşük erime noktasına sahip organik tuzların bir sınıfıdır. Son zamanlarda, çevre dostu çözücüler geliştirmek amacıyla, iyonik sıvılar ihmal edilebilir bir buhar basıncına sahip oldukları ve kimyasal veya enzimatik reaksiyonlar gibi farklı uygulamalar için polarite ve seçicilik açısından uyarlanabildikleri için artan bir ilgi görmüştür (Welton, 1999). İyonik sıvılara benzer fiziksel özelliklere ve faz davranışına sahip bir diğer çözücü türü de derin ötektik çözücülerdir (Abedin vd, 2007). Günümüzde kullanılan yaygın yeşil çözücüler Şekil 1’de verilmiştir.

Yüksek basınç teknolojisi, özel niteliklere sahip tamamen yeni ürünlerle sonuçlanan çeşitli süreçlerin geliştirilmesine yol açan nispeten yeni bir araçtır. Bu alanda süperkritik akışkanlar ayrıcalıklı bir konuma sahiptir ve hem basınç hem de sıcaklığın kritik değerlerin üzerinde olduğu maddelerdir. Süperkritik akışkanlar (SKA) sürdürülebilir, çevre dostu, uygun maliyetli ve yeni ürünler elde etme imkanı sunar. SKA’lar gaz-sıvı özellikleriyle, yani gaz benzeri viskozite, difüzyivite, sıvı-benzeri yoğunluk ve çözünme özellikleriyle karakterize edilir. SKA’ların endüstriyel süreçlerde kullanılmasının, çalışma sırasında düşük enerji tüketimi gibi çevresel faydaları, çevreye çok daha fazla zarar veren geleneksel organik çözücülerin yerini alma potansiyellerini göstermektedir. Bu nedenle SKA’lar bazen “yeşil çözücüler” olarak da adlandırılır. Süperkritik akışkanları kullanarak; ilaçlar, boyalar, organometalik bileşikler ve diğer biyoaktif bileşikler, endüstriyel alanlarda uygulama alanı bulmaktadır (Knez vd., 2014).

Biyo-bazlı çözücüler; yenilenebilir kaynaklardan, genellikle mısır, buğday veya pancar gibi karbonhidrat bakımından zengin tarımsal ürünlerden veya uzun süredir atık olarak kabul edilen artık organik maddelerden elde edilir, ancak bunlar biyo-bazlı çözücülerin tek kaynağı değildir.



Şekil 1. Yaygın olan yeşil çözücüler (Torres-Valenzuela & Ballesteros-Gómez, 2019)

Biyo-bazlı çözücüler, mahsuller, ormancılık kalıntıları ve diğer bitki bazlı malzemeler gibi yenilenebilir biyokütle kaynaklarından elde edilir. Bu tür solventler, yenilenebilir olmayan ve olumsuz çevresel etkileri olan petrokimyasallardan elde edilen diğer geleneksel solventlere alternatif olarak popülerlik kazanmaktadır. Biyo-bazlı çözücülerin kullanımı diğer geleneksel çözücülere göre çeşitli avantajlara sahiptir. İlk olarak, biyo-bazlı çözücüler yenilenebilir kaynaklardan elde edildikleri için genellikle daha sürdürülebilir ve çevre dostudur. Buna ek olarak, genellikle daha düşük toksisiteye sahiptirler ve insan sağlığı için daha güvenlidirler.

Son olarak, bazı durumlarda, daha yüksek çözünürlüğe ve diğer kimyasallarla daha iyi uyumluluğa sahip olabilirler. Fakat biyo-bazlı çözücülerin, yenilenebilir biyokütlenin tedarik edilmesi ve işlenmesinin daha yüksek maliyeti nedeniyle diğer geleneksel çözücülere göre daha yüksek olabilen üretim maliyetiyle ilgili bazı dezavantajları da vardır (Jing vd., 2022) (De Jong vd., 2012). Biyo-bazlı çözücü olarak alkoller, terpenler, gliseroller, esterler ve furfurallar bazı biyobazlı çözücüler olarak tanımlanmıştır (Li vd., 2016).

Supramoleküler çözücüler (SUPRAÇ), amfifilik (çift karakterli) bileşiklerin kolloidal çözeltilerinde kendiliğinden, ardışık kendi kendine birleşme ve koaservasyon olayları ile

üretileen nanoyapılı sıvılardır. SUPRAÇ'lar, uçucu olmayan ve yanıcı olmayan doğal veya sentetik iyi huylu amfifillerden ve koaservatif ajanlardan oluşabilir. Öte yandan, SUPRAÇ'ların yüksek ekstraksiyon verimliliği, çözünen madde çözünürleştirilmesi için çok küçük hacimlerin kullanılmasına olanak tanıyarak reaktif tüketimini en aza indirir.

Supramoleküler kimya günümüzde olgunlaşmış bir disiplindir. Onları oluşturan moleküllerin amfifilik karakterinden ve yüksek konsantrasyonlarından dolayı supramoleküler çözücüler; nanoyapılar, çözünenler için çeşitli etkileşim türleri ve sonuç olarak çözünürleştirilmeleri için karışık mekanizmalar sunan farklı polarite bölgelerine sahiptir. Sonuç olarak, geniş bir polarite aralığındaki çözünenler aynı anda ve verimli bir şekilde ekstrakte edilebilir (Cabollo vd., 2017).

Neoterik çözücüler, yapısal olarak yeni veya geleneksel olmayan ve genellikle kimyasal bileşenleri değiştirilerek bir dizi uygulama için hassas bir şekilde ayarlanabilen fiziksel ve kimyasal özelliklerle karakterize edilen çözücüler ifade eden bir terimdir (Torres-Valenzuela ve Ballesteros-Gómez, 2019). Neoterik çözücüler arasında en fazla ilgiyi fluorous çözücüler, iyonik sıvılar ve ötektik çözücüler görmüştür.

Florlu çözücüler, perflorooktan, perflorohekzan, perfloro (metil siklohekzan), perflorodekalin, perflorotribütülin ve perfloropolietir gibi yüksek oranda florlu bileşiklerden yapılır (Matsuda vd., 2013). Hem su hem de organik fazlarla karışmamaları nedeniyle "üçüncü sıvı faz" olarak adlandırılırlar, bu da ayırma işlemlerinde yeniden kullanımlarını ve uygulamalarını kolaylaştırır.

1.4. Derin Ötektik Solventler (DÖS)

Derin ötektik solventler (DÖS'ler), iyonik sıvılarla ilgili yeni ortaya çıkan bir yeşil çözücü sınıfı olarak kabul edilir. Abbott ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmanın, belirli hidrojen bağı vericileri (HBD'ler) ve alıcılarının (HBA'lar) ötektik bileşiminde anormal derecede derin bir erime noktası çöküşü kaydetmesinin ardından son yirmi yılda artan bir ilgi görmüştür (Hansen vd., 2020). Abbott ve arkadaşları bu olguyu tanımlamak için sıvıyı "derin" ötektik solvent (DÖS) olarak adlandırmıştır.

Derin ötektik solventler özellikle son on yılda yoğun olarak çalışılmış olmasına rağmen, oluşumu ve özellikleri arkasındaki prensip hala yeterince anlaşılamamıştır. Her şey, Abbott ve arkadaşlarının, yaygın olarak kullanılan bazı iyonik sıvıların nem hassasiyetini ve yüksek maliyetini aşabilen sıvılar arayışına girmeleriyle yaklaşık yirmi yıl önce başladı.

Bu çalışmada, farklı kuaterner amonyum tuzları ve metal tuzlarına dayalı çok sayıda karışım test edildi. 1:2 mol oranında çinko klorür ile karıştırılan kolin klorürün en düşük donma noktasını (23–25 °C) gösterdiği ortaya çıktı. Kuaterner amonyum tuzları ve hidrojen bağı donörlerinin ötektik karışımlarını araştırdılar ve bunlara "derin ötektik çözücüler" adını verdiler (Abbott vd., 2003). Daha sonra kolin klorür ve karboksilik asit esaslı diğer derin ötektik çözücüler karakterize edildi. Bunların da bazı metal oksitlere karşı önemli bir çözücülük yeteneğine sahip olduğu gösterildi. DÖS'lerin çoğu tuzlar ve moleküler bileşenler gibi iyonik olmayan türlerden elde edilir. DÖS'lerdeki en önemli molekül içi bağlar, kolin klorür:üre ([CC-Cl]-[U]) DÖS oluşumu, hidrojen bağı vericileri (HBD) ile halojenür anyonu arasındaki hidrojen bağlarıdır. Başlangıç bileşenlerindeki fonksiyonel grupların oluşumuna bağlı olarak, bazı DÖS'ler daha yüksek HBD-HBD hidrojen bağı etkileşimleri gösterebilir (Mobus vd., 2017). İyonik sıvılara benzer şekilde, DÖS'ler kimyasal olarak uyarlanabilir çözücülerdir. Çünkü çeşitli dördüncül amonyum tuzlarını (örn. CC-Cl) farklı hidrojen bağı donörleriyle (HBD) uygun şekilde birleştirerek tasarlanabilir. Bu nedenle, donma noktası, viskozite, iletkenlik ve pH gibi farklı fizikokimyasal özelliklere sahip görev-spesifik DÖS'ler hazırlanabilir. DÖS'lerin ümit verici uygulamalarından dolayı fizikokimyasal karakterizasyonuna yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Geniş hidrojen bağı ağı, DÖS'lerin düşük erime noktaları, düşük uçuculuk, alev almazlık, düşük buhar basıncı, dipolar yapı, kimyasal ve termal kararlılık, yüksek çözünürlük, ayarlanabilirlik, yüksek viskozite, yüksek yoğunluk, su ile kimyasal inertlikleri nedeniyle depolama kolaylığı, düşük toksisite ve yüksek biyolojik bozunabilirlik gibi kendine has özelliklerinden sorumludur (Florindo vd., 2014; Zhang vd., 2012).

HBA ile HBD arasındaki etkileşimler çoğunlukla hidrojen bağları, ara sıra elektrostatik kuvvetler ve van der Waals etkileşimlerini içerir (Zhang vd., 2012).

Derin ötektik solventler dört tipte gruplandırılmıştır;

- Tip I- Dörtlü amonyum tuzu ve metal tuzu
- Tip II- Dörtlü amonyum tuzu ve metal tuzu hidrati
- Tip III- Dörtlü amonyum tuzu ve hidrojen bağı donörü
- Tip IV- Metal tuzu ve hidrojen bağı donörü (Abbott vd., 2003)

Tip I'de, dörtlü amonyum tuzu ile bir organik tuzla oluşan metal halojenürlerden ($ZnCl_2$, $FeCl_3$ veya $SnCl_2$) oluşmaktadır. Bu tipteki derin ötektik çözücülerin donma sıcaklığı, metal içeren maddelerin oranına bağlıdır (Leroy vd., 2012; Basta vd., 2013).

Tip II’de metal tuzlarının hidratları, gelişmiş ve büyük ölçekli endüstriyel çalışmalarda neme duyarlılık sorununu çözüme kavuşturmaktadır (Pizzi ve Tekely, 1995). Tip III’de kolay hazırlanan, suyla reaksiyon vermeyen, düşük maliyeti, biyolojik açıdan parçalanabilen, polialkoller ve poliamitler içeren hidrojen bağ donörü olarak tanımlanan, organik tuz içeren karışımlardır (Davis, 2015; Maiti vd., 2013). Tip IV, organik tuz yerine metal tuzu içerir.

1.5. Propolis

Propolis (arı tutkalı veya arı zambkı), arılar tarafından toplanan ve kovanda işlenen, bitkilerin tomurcuklarından, çiçeklerinden ve yapraklarından salgılanan reçineli maddelerden türetilmiş, arı salgıları ve balmumu ile modifiye edilmiş yapışkan bir bileşiktir. Bu madde, reçineler, balmumları, polifenoller, polisakkaritler, uçucu bileşenler gibi biyoaktif bileşenlerin yanı sıra antibakteriyel, anti-anjiojenik, antiülser, anti-inflamatuvar, antioksidan ve antiviral özelliklere sahip sekonder metabolitleri içerir (Simone-Finstrom vd., 2017). Propolis, arıların topladığı bitki reçinelerini kovana taşıyıp, yuvanın çeşitli bölgelerine dağıtarak kullandıkları arıcılık terimidir. Reçineyi işleyen arılar, kendi ürettikleri balmumu ile karıştırarak bu maddeleri yuvada kullanır (Simone-Finstrom vd., 2010). Propolisin ana kimyasal bileşenleri, bitkilerden elde edilen reçinelerden türetilse de, bazı araştırmalar arıların glandüler salgılarının (örneğin β -glukosidaz) propolise katkı sağladığını göstermektedir (Zhang vd., 2011).

Propolis üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmı, kimyasal bileşenlerin tanımlanmasına ve çeşitli özütlerin, fraksiyonların ve belirli bileşiklerin biyoaktivitesinin anlaşılmasına odaklanmaktadır. Bu çalışmaların çoğu, insan sağlığına yönelik potansiyel uygulamalarda kullanılabilecek yeni bileşiklerin keşfiyle ilgilidir (Silva-Carvalho vd., 2015). Zaman içinde, bu konu çeşitli sistematik incelemelerle ele alınmış, dünya genelinde toplanan propolis örneklerinde tespit edilen yeni kimyasal bileşiklerin sayıları düzenli olarak güncellenmiş ve biyolojik aktivite verileri sıklıkla bu bilgilere eklenmiştir. Şu ana kadar, propolis örneklerinde değişken biyolojik aktivitelere sahip 300’den fazla bileşik tanımlanmıştır (Huang vd., 2014).

Ham propolis (Şekil 2) suda az çözünen bir karışımdır. Propolis, 25-45 °C’de oldukça yapışkan bir yapıya sahiptir. Propolisin yapışkan özelliği, sıcaklığın artmasıyla artmakta ve 60-70 °C’de sıvı halde bulunmaktadır. 15 °C’den düşük sıcaklıklarda ise donuk, kırılkan ve sert bir yapıya sahiptir (Krell, 1996). Propolis, yüzyıllardır apiterapinin vazgeçilmez bir

bileşeni olup, son yıllarda geleneksel ve tamamlayıcı tıp adı altında gıda katkı maddesi veya takviye edici gıda olarak kullanılmaktadır (Anjum vd., 2019; Pobiega vd., 2019). Toplandığı bölgenin florasına göre bileşimi değişmekle birlikte, propolisin etken maddelerinin büyük çoğunluğu polifenol ailesindendir. Propolis çiğ olarak tüketilmemektedir. Genellikle etanol ve sulu ekstraktları farklı formülasyonlarda yaygın olarak tüketilmektedir. Propolis örneklerinin en aktif fenolik maddelerinin gallik asit, kafeik asit, protokatekuik asit, krisin, kuersetin, rutin, galangin, kemferol, hesperetin, pinosembrin, pinobanksin, apigenin, luteolin, daidzein, kafeik asit fenil esteri (CAPE) gibi polifenolik maddeler olduğu ve bu sekonder metabolitlerin propolis kaynağına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Guler vd., 2021).



Şekil 2. Ham propolis

Flavonoidler polifenollerin en önemli ve en büyük alt sınıfını oluşturan, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve geniş biyolojik aktiviteler gösteren bir grup polifenollerdir. Genellikle güçlü antioksidan özellikleriyle bilinen flavonoidler, aynı zamanda anti-inflamatuvar, antikanserojen, antibakteriyel ve antimikrobiyal etkiler de sergileyebilirler.

Bu bileşikler, bitkilerde renk, tat ve kokuyu belirleyerek onları zararlılardan korumada rol oynar. İnsan sağlığı üzerinde pek çok faydalı etkisi olduğu düşünülen flavonoidler, meyveler, sebzeler, çay ve kırmızı şarap gibi gıda ürünlerinde bulunur.

Flavonoidlerin, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde ve yaşlanma sürecine karşı koruyucu etkilerde bulunabileceği öne sürülmektedir (Talla vd., 2014, Ma vd., 2024; Liu vd., 2024).

Propolisin içeriğine bakıldığında %50'sini reçine ve zamsı maddeler, %30'unu bitkisel mumlar, %10'unu esansiyel yağlar, %5'ini polen ve %5'ini de organik bileşikler ve mineral maddeler oluşturmaktadır. Tamamen doğadan gelen propolis, içerisinde bulunan çeşitli polifenolik bileşikler, mineraller ve enzimler sayesinde antioksidan, antiviral, antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar gibi biyolojik aktiviteler göstermektedir (Russell, 1983; Bogdanov, 1997; Cook ve Saman, 1996; Hepşen vd., 1996).

Antibiyotiklere direnç, bakterilerin, antibiyotik tedavisine karşı geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır ve dünya genelinde ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu direnç, yanlış veya aşırı antibiyotik kullanımı sonucunda gelişir, böylece enfeksiyonlar tedavi edilemez hale gelir. Propolis, antibakteriyel özellikleri sayesinde bu sorunun çözülmesinde önemli bir rol oynayabilir. Propolisin, antibiyotiklere karşı dirençli bakterilere karşı etkili olduğu ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği araştırmalarla gösterilmiştir (Cora vd., 2024).

Propolis, hücre kültür çalışmalarında çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurduğu, kanser hücrelerini apoptoza sürüklediğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar şimdilik propolisin önemli bir potansiyele sahip olduğunu gösterse de ilaç gelişimi için Faz II ve Faz III çalışmalarının tamamlanması gerekmektedir. (Valivand vd., 2024; Vazhacharickal, 2021).

Propolis, antialerjik, anti-inflamatuvar, antimikrobiyal özellikleri ve kolajen sentezini destekleyici etkisi nedeniyle cilt bakım ürünlerinde, özellikle krem ve merhemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Propolisin yara yataklarının iyileşmesinde serbest radikal aktivitesini belirgin şekilde azalttığı, yara onarım sürecini desteklediği ve akne vulgaris tedavisinde yüksek etkinlik sağladığı görülmüştür. Propolis ayrıca dokuların kolajen içeriğini artırarak yara iyileşme sürecinde yarada pozitif kolajen metabolizması gösterir. Propolis, insan diyabetik ayak ülseri altında yara kapanmasını desteklemek için yara iyileşmesi için alternatif bir tedavi olarak kullanılır (Vazhacharickal, 2021). Propolisin diyabetik, venöz, cerrahi yaralar, yanık vb. gibi cilt yaraları için alternatif bir tedavi yöntemi olarak potansiyeli, esas olarak antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, analjezik ve anjiyogenezis destekleyici etkileri gibi kanıtlanmış özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Da Rosa vd., 2022)

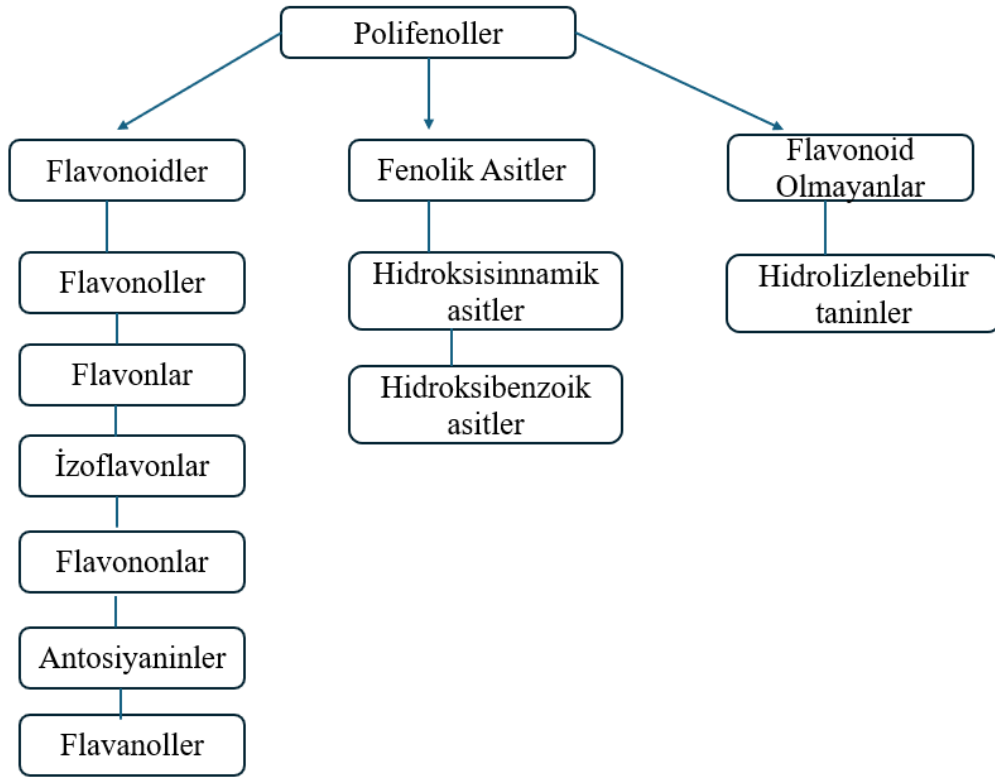
1.6. Polifenoller

Kimyasal olarak polifenoller, fenolik yapısal özelliklere sahip bir grup doğal bileşiktir. Kimyasal açıdan kesin bir dille ifade etmek gerekirse, “fenoller” terimi aren halkasını ve onun hidroksi ikame edicisini içermektedir. Bu kavrama göre, “polifenol” terimi, her birinin taşıdığı hidroksi gruplarının sayısından bağımsız olarak, en az iki fenolik kısım taşıyan yapılarla sınırlandırılmalıdır (Quideau vd., 2011). Fenolik bileşikler bitkilerde sekonder metabolitlerin en büyük ve en yaygın gruplarından birini oluştururlar (Scalbert ve Williamson, 2000). Daha önce de belirtildiği gibi polifenoller, sadece polifenol yapısına sahip çok çeşitli molekülleri (örneğin aromatik halkalar üzerinde birden fazla hidroksil grubu) değil, aynı zamanda fenolik asitler ve fenolik alkoller gibi tek fenol halkalı molekülleri de içerir.

Polifenoller kimyasal olarak fenolik yapısal özelliklere sahip bileşikler olarak tanımlanmakla birlikte, bu doğal ürün grubu oldukça çeşitlidir ve fenolik bileşiklerin birkaç alt grubunu içerir. Biyogenetik olarak fenolik bileşikler iki metabolik yoldan ilerler. Başlıca fenilpropanoidlerin oluştuğu şikimik asit yolu ve başlıca ürünlerin basit fenoller olduğu asetik asit yoludur (Sánchez-Moreno, 2002).

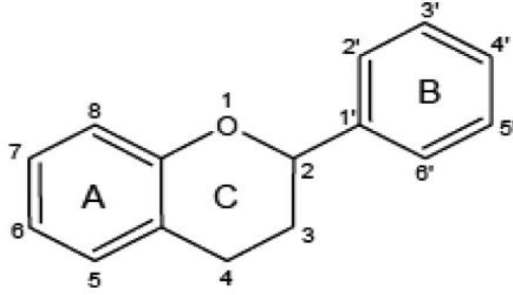
Binlerce farklı polifenolik bileşiğin (bunların arasında 8150'den fazla flavonoid ihtiva eder) çok çeşitli yapılara sahip olduğu belirlenmiştir (Lattanzio vd., 2008). Bitkilerdeki polifenollerin çeşitliliği ve geniş dağılımı, Şekil 3' de görülebileceği gibi, bu doğal olarak oluşan bileşiklerin farklı kategorilere ayrılmasına yol açmıştır (Balasundram vd., 2006).

Flavonoidlerdeki konjuge çift bağlar ve karbonil grubu, kararlı elektron delokalizasyonuna olanak tanır ve birden fazla hidroksil grubuyla birleşerek, bu moleküllere in vitro güçlü antioksidan ve şelat oluşturunca özellikler kazandırır.



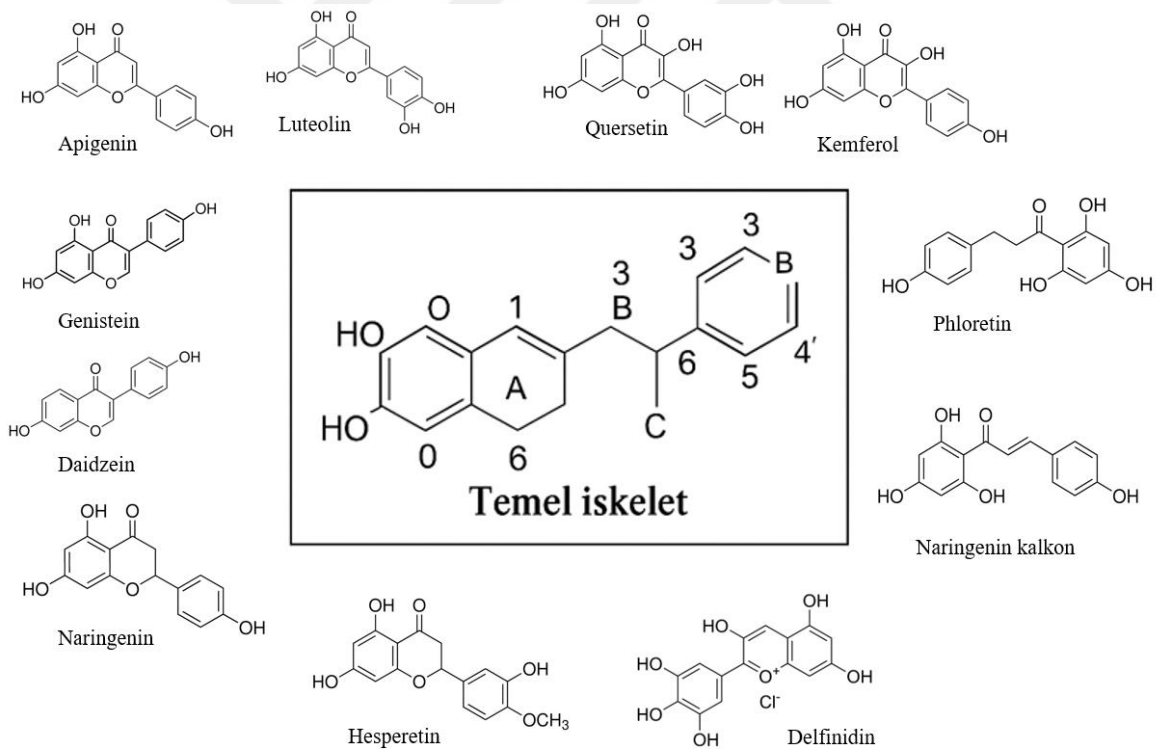
Şekil 3. Polifenollerin sınıflandırılması

Flavonoidlerdeki konjuge çift bağlar ve karbonil grubu, kararlı elektron delokalizasyonuna olanak tanır ve birden fazla hidroksil grubuyla birleşerek, bu moleküllere in vitro güçlü antioksidan ve şelat oluşturuıcı özellikler kazandırır. Flavonoidler, 250 nm bölgesinde ultraviyole emilim spektrumlarıyla gösterilen aromatik kromoforlara (seçici ışık emilimi olan yapılar) sahiptir (Corcoran vd., 2012). Flavonoidlerin kimyasal yapısı Şekil 4’ de gösterilmiştir. B halkasının C halkasının 3. pozisyonuna bağlı olduğu flavonoidlere izoflavonlar denir. B halkasının 4. pozisyonuna bağlı olduğu flavonoidlere neoflavonoidler denirken, B halkasının 2. pozisyonuna bağlı olduğu flavonoidler C halkasının yapısal özelliklerine göre birkaç alt gruba ayrılabilir. Flavonoidler, B halkasının bağlı olduğu C halkasının karbonuna ve C halkasının doymamışlık ve oksidasyon derecesine bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılabilir (Panche vd., 2016).



Şekil 4. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Flavonoidler, bitkilerde aromatik aminoasitler olan fenilalanin ve tirozin ile malonattan oluşur. Flavonoidlerin temel yapısı, A, B ve C olarak adlandırılan üç halkada ($C_6-C_3-C_6$) düzenlenmiş 15 karbon atomundan oluşan flavan çekirdeğidir (Pietta, 2000).



Şekil 5. Flavonoidlerin temel iskelet yapısı ve sınıfları (Saini vd., 2024)

Flavonoidlerin yapılarında bulunan –OH grupları, onların farklı özellikler davranış sergilemesine neden olur. Bu yüzden alt gruplar şeklinde görülürler (Şekil 5); flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller veya kateşinler, antosiyaninler ve kalkonlar (Panche vd., 2016). Flavonoidler genellikle bitkilerde glikozlanmış türevler olarak bulunur ve yapraklarda, çiçeklerde ve meyvelerde parlak mavi, kırmızı ve turuncu tonlarına katkıda bulunurlar. Çeşitli sebze ve meyvelerin yanı sıra, flavonoidler tohumlarda, kuruyemişlerde, tahıllarda, baharatlarda ve farklı tıbbi bitkilerde ve ayrıca şarap (özellikle kırmızı şarap), çay ve (daha düşük seviyelerde) bira gibi içeceklerde bulunur (Pietta, 2000). Fenolik ve flavonoid bileşiklerin indirgeme aktivitesi, moleküler yapıdaki serbest hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır ve bu durum sterik engelleme ile güçlenir (Rice-Evans vd., 1996).

Polifenollerdeki diğer bir sınıf olan fenolik asitler, gıdalara tipik organoleptik özellikler kazandıran aromatik sekonder metabolitler olan hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler başlıca fenolik asitlerdir (Rashmi ve Negi, 2020). Meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi çeşitli bitki kaynaklarında bulunan ve bitkilerin farklı kısımlarına dağılmış fenolik bileşikler altında gruplandırılan biyoaktif kimyasalların en belirgin sınıfıdır (Karasawa ve Mohan, 2018; Stuper-Szablewska ve Perkowski, 2019).

Bitkilerdeki fenolik içeriğin artırılması, kalitelerini artırabilir. Fenolik bileşikler, bitkilerin büyümesi ve üremesi için çok önemlidir ve çevresel faktörlere (ışık, soğutma, kirlilik vb.) yanıt olarak ve yaralı bitkileri savunmak için üretilir (Valentine vd., 2003). Fenolik asit bileşikleri ve fonksiyonları çok sayıda tarımsal, biyolojik, kimyasal ve tıbbi çalışmanın konusu olmuştur. Bu bileşikler yaygın olarak dağıtılmış hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitleri (Tablo 1) içeren çeşitli bir grup oluşturur (Mandal vd., 2010). Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısındadır. Bitkisel gıdalarda az miktarda bulunurlar. Gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, *m*-OH benzoik asit, hidroksibenzoik asit sınıfı üyelerini oluşturmaktadır. Hidroksisinnamik asitler, C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar (Balasundram vd., 2006). Fenolik asitler, polar karakterde olduğu için suda çözünürlükleri fazladır. Flavonoidlerin suda çözünme durumu modifikasyonlarına göre değişiklik gösterir. Kuersetin ve rutin gibi suda çözünürlüğü yüksek olan bileşiklerde, hidroksil sayısı fazla ve şekerler ile glikozit bağı oluşturan yapılar mevcuttur. Alkil grubu içeren flavonoidin suda çözünürlüğü düşüktür (Pujirahayu vd., 2014). Örnek olarak, kafeik asitin suda çözünmesi yüksek olmasına rağmen kafeik asit fenil esterlerinin çözünmesi düşüktür (Widjaja vd., 2008).

Tablo 1. Bazı fenolik bileşen örnekleri (Munin ve Edwards-Lévy, 2011)

	Örnekler	Kaynağı
Fenolik Asit ve Kumarinler		
Hidroksi benzoik asitler	Gallik asit, vanilik asit, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit	Çay, kırmızı meyveler
Hidroksisinnamik Asitler	Kafeik asit, ferulik asit	Meyveler (yaban mersini, elma)
Kumarinler	Ombelliferon, skopoletin	Tonka fasulyesi, kestane,
Stilbenler (C6-C2-C6)	Resveratrol	Tıbbi bitkiler (asma)
Flavonoller	Mirisetin, kuersetin	Meyve-sebzeler kırmızı şarap, çay
Flavanlar	Apigenin, luteolin, sinensetin	Maydanoz, kereviz, tahıllar (buğday)
Flavanonlar	Hesperetin, naringenin	Narenciye (greyfrut, turunç)

Yüksek flavonoid ve polifenol içeren propolisin anti-inflamatuar özellikleri, Avrupa propolisinde bulunan kafeik asit fenil esterine (CAPE) bağlanmaktadır. CAPE, özellikle inflamatuvar süreçte önemli bir rol oynayan Nükleer Faktör kappa B aktivitesini inhibe ederek çeşitli inflamatuvar yolları etkili bir şekilde modüle eder (Kurek-Górecka vd., 2023). Etkili kırışıklık karşıtı çözümler arayışı, cilt bakımında fenolik asitlerin potansiyeline olan ilgiyi de artırmıştır. Ferulik asit, kafeik asit ve diğerleri gibi fenolik asitler, umut verici kırışıklık karşıtı özelliklere sahip temel kozmesötik bileşenler olarak tanımlanmıştır (Radić vd., 2024).

Bitkisel floradan elde edilen salgıların sahip olduğu içerik bilindiği ölçüde, o kaynaktan elde edilen propolisin de benzer bir yapıya sahip olacağı düşünülmektedir. Bitki kaynaklarına göre gruplandırılan propolis türleri Tablo 2’ de verilmiştir.

Örneğin Kavak tipi propolis örneklerinde düzenli olarak belirlenen fenolik bileşikler arasında, pinobanksin, naringenin, sinnamik asitler, kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit fenil ester; Pasifik tipi propolis örneklerinde C-prenil flavanonları içerdiği bilinmektedir (Groot vd., 2013).

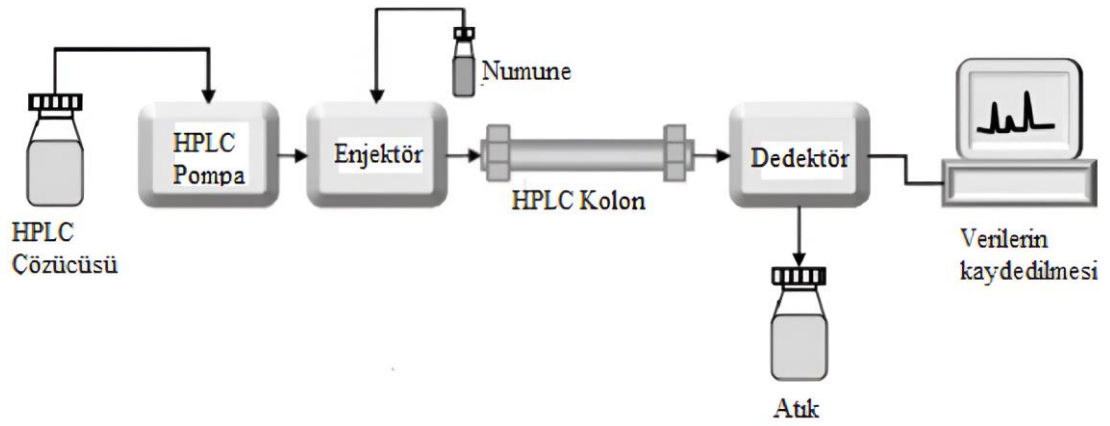
Tablo 2. Bitki kaynağına göre gruplandırılan propolis türleri (Groot vd., 2013)

Propolis Türü	Coğrafik Bölge	Bitki kaynağı	Ana bileşenleri
Poplar (Kavak)	Avrupa, Amerika, Asya, Yeni Zelanda, Çin	Populus türleri özellikle Aigeiros türü ve sıklıkla P. Nigra L.	Flavonlar, flavanonlar, pinosembrin krisin, galangin, sinamik asitler, kafeik asit
Yeşil Brezilya Propolisi	Brezilya	Brazil Baccharis türleri predominantly, B. Dracunculifolia DC	Prenil <i>p</i> -kumarik asitler, diterpenik asitler, prenil asetofenonlar
Huş Ağacı Propolisi	Rusya	Betula verrucosa Ehrh	Akasetin, apigenin, ermanin, rhamnositrin, kaempferid,
Kırmızı propolis	Küba, Brezilya	D. ecastophyllum ve diğer Dalbergia türleri	İzoflavanoidler (terokarpans, izoflavanlar)
Akdeniz Propolisi	Sicilya, Yunanistan, Girit, Malta	Cupressaceae (türler belirlenemedi)	Diterpenler Antrakininonlar
Clusia Propolisi	Küba, Venezüella	Clusia türleri içeren C. Major, C. minor	Poliprenillenmiş benzofenonlar
Pasifik Propolisi	Pasifik (Okinawa, Tayvan)	Macaranga tanarius	C-prenil flavanonlar

1.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerini ayırmak amacıyla kullanılan analitik ayırma bir yöntemidir. Bu yöntemde, bileşenlerin mobil faz ve sabit faz arasındaki etkileşim farklarına dayanarak, her bileşenin farklı hızlarla hareket etmesini sağlar. Kromatografik ayırma işlemi, bileşenlerin sabit fazla farklı derecelerde etkileşime girerek ayrılmasını sağlar ve bu süreç, karışımındaki her bir bileşenin zamana bağlı olarak ayrılmasını mümkün kılar. Kromatografi, gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (HPLC) ve kâğıt kromatografisi gibi çeşitli teknikler ile uygulanabilir.

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), sıvı kromatografisinin bir çeşidi olup, yüksek basınç altında sıvı mobil faz kullanarak bileşenlerin ayıran gelişmiş bir yöntemdir. Bu teknikte, örnek, mobil faz aracılığıyla sabit faza (genellikle silika jel) pompalanır. Bileşenler, sabit fazla farklı düzeylerde etkileşimde bulunarak kolon boyunca farklı hızlarla hareket eder. Bu etkileşim farkları, bileşenlerin kolon boyunca ayrılmasına yol açar ve sonuçta dedektörler tarafından ölçülerek bileşenlerin tanımlanmasını sağlar. HPLC, özellikle kompleks karışımları hızlı, hassas ve yüksek çözünürlükle analiz edilmesine fırsat sağlayan bir tekniktir. Çalışma prensibi Şekil 6’ da özetlendi (Keskin, 2018).



Şekil 6. HPLC cihazının şematik görüntüsü (Keskin, 2018).

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) sistemlerinde kullanılan kolonlar, bileşenlerin ayrılmasında önemli rol oynamaktadır. Genellikle silika bazlı materyallerden oluşan bu kolonlar, farklı fonksiyonel gruplar içerir ve bileşenlerin sabit fazla etkileşerek farklı hızlarla hareket etmelerini sağlamaktadır.

HPLC kolonları üç ana türe ayrılır: Normal faz kolonları, polar çözücülerle apolar bileşenlerin ayrılmasında kullanılır. Ters faz kolonları, apolar yüzeylere sahip olup, polar bileşenlerin daha hızlı hareket ettiği analitik çalışmalarda tercih edilir. İyon değişim kolonları ise iyonik bileşenlerin ayrılması için kullanılır. Kolonun boyutu, partikül büyüklüğü ve kimyasal özellikleri, analizlerin doğruluğu ve verimliliği üzerinde önemli etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

HPLC de kullanılan ayırma kolonları ve dedektörler analizin amacına göre değişir. En yaygın kullanılan dedektörler arasında UV-Vis dedektörleri, floresan dedektörleri, kırılma indisi dedektörleri ve kütle spektrometreleri yer alır. UV-Vis dedektörleri, örneğin, bileşenlerin ultraviyole veya görünür ışık bölgesinde absorbansını ölçerek tespit yapar, genellikle organik bileşenlerin analizinde kullanılır. Floresan dedektörleri, bileşiklerin floresan özelliklerinden yararlanarak daha hassas tespitler sağlar. Kırılma indisi dedektörleri, mobil fazın optik kırılma indeksindeki değişiklikleri algılar, özellikle şeker analizlerinde kullanılır. Ayrıca PDA (Photodiode Array) dedektörü, prensip olarak UV-Vis dedektöre benzese de birden fazla dalga boyunda ışık Emilimini ölçen bir dedektör türüdür. PDA dedektöründe, her bir bileşiğin UV-Vis spektrumunu elde etmek için kullanılır ve bununla birlikte birden çok dalga boyunda verilerin toplandığı bir analiz yapısı (Shinde ve Rajurkar, 2024; Eser ve Dinçel, 2018).

1.8. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, bir maddeyi bir karışımdan ayırmak amacıyla kullanılan bir işlem tekniğidir. Bu yöntemle göre, hedef bileşiğin çözünürlüğü veya diğer fiziksel ve kimyasal özelliklerine dayanarak, bir fazdan başka bir faza (genellikle bir sıvı fazdan başka bir sıvı faza veya katı faza) transferini sağlar. Çeşitli ekstraksiyon yöntemleri arasında sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu ve süperkritik sıvı ekstraksiyonu yer almaktadır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bir bileşiğin veya bileşikler karışımının bir sıvı fazdan diğerine geçmesini sağlamak amacıyla kullanılan bir ayırma işlemidir. Bu yöntem, genellikle iki karışmayan sıvı faz (örneğin su ve organik çözücü) kullanılarak gerçekleştirilir. Ekstraksiyon sırasında, hedef bileşik bir fazdan diğerine geçer; bu geçiş, bileşiğin çözünürlük özelliklerine ve her iki fazla olan etkileşimine bağlıdır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu; kimya, biyoteknoloji ve farmasötik endüstrilerde yaygın olarak kullanılır ve karmaşık karışımlardan saf bileşenlerin ayrılmasında etkili bir

yöntemdir. Bu süreç, özellikle polar ve apolar bileşiklerin ayrılması için uygundur ve sıklıkla analitik ve preparatif amaçlarla tercih edilir.

Ham propolis de bulunan biyoaktif bileşikleri ekstrakte etmek için genellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılır. Etanol en yaygın kullanılan solvent olup, su, bitkisel yağlar ve süperkritik ekstraktlarda kullanılmaktadır. Yapılan çok sayıda araştırma da etanolün özellikle %65 ile %80 arasındaki konsantrasyonu fenolik bileşiklerin özütlemesinde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Kolaylı ve Birinci, 2024).

1.9. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, bileşiğin genellikle katı, sıvı veya gaz formunda karışmayan bir madde içerisinde hapsedilmesi işlemidir (Rehman vd., 2019). Bu süreç, bileşenlerin tüm özelliklerini koruyarak, belirli koşullar altında kapsül içinde hapsedilmelerini ve kontrollü salınımlarının yapılmasını sağlar (Nedovica vd., 2011). Enkapsülasyonun temel amacı, çekirdek malzemeyi ışık, nem ve oksijen gibi zarar verici olumsuz çevresel faktörlerden korumak; bu sayede ürünün raf ömrünü uzatmak ve kontrollü serbest kalmasını sağlamaktır (Shahidi ve Han, 1993). Kapsüller boyutlarına göre sınıflandırılır; 200 nm ve daha küçük olanlar nanoenkapsülasyon, 0,2-5000 µm arasındaki kapsüller mikroenkapsülasyon, 5000 µm'den büyük olanlar ise makroenkapsülasyon olarak adlandırılmaktadır.

Enkapsülasyon yapılırken en önemli basamak, kapsülasyon için uygun kaplama materyalinin (kapsül) seçilmesidir. Kapsül için kullanılacak materyalin, kapsülün boyutunu, şeklini ve geçirgenlik özelliklerindeki değişiklikleri göstermektedir. Kapsül yapımında ideal bir kaplama materyali; toksik olmamalı, kolay uygulanabilmeli, tam koruma sağlarken kapsüllerin yapıldığı destek materyal bir karışımdan oluşabileceği gibi tek bir maddeden de oluşabilmelidir. Kapsül oluşturma tekniklerinde kaplama materyalleri olarak genellikle; proteinler, doğal ve modifiye polisakkaritler, gamlar, yağlar veya sentetik polimerler, jelâtin, pektin, nişasta, peyniraltı suyu gibi maddeler tercih edilmektedir (Gaserod vd., 1998).

1.10. Enkapsülasyon Yöntemleri

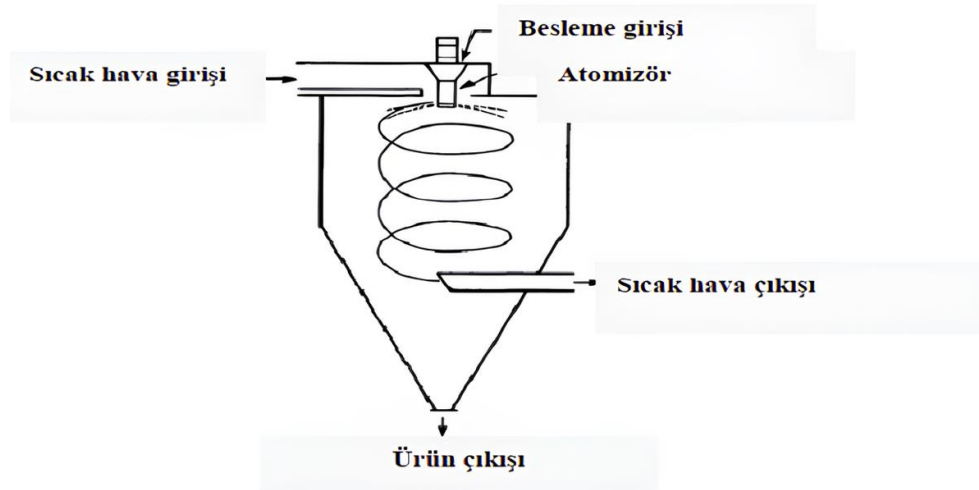
Enkapsülasyon işlemi, aktif bileşenlerin korunması ve kontrollü salınımlarının sağlanması için çeşitli yöntemler kullanılarak yapılır ve bu yöntemler üç ana kategoriye ayrılmaktadır. Fiziksel yöntemler, örneğin püskürtmeli kurutma, püskürtmeli soğutma, ekstrüzyon ve akışkan yataklı kaplama; Fizikokimyasal yöntemler, lipozomların kullanımı

ve koaservasyon; Kimyasal yöntemler ise moleküler inklüzyon ve ara yüz polimerizasyonunu içerir (Park vd., 2005; Poshadri vd., 2010). Bu teknikler, aktif bileşenlerin çevresel faktörlerden korunmasını ve istenilen özelliklerde salınımlarının sağlanmasını mümkün kılar.

1.10.1. Püskürtmeli Kurutma

Püskürtmeli kurutma yöntemi, enkapsülasyon teknolojisinde kullanılan en eski ve en yaygın metot olarak bilinmektedir. Püskürtmeli kurutma yöntemin kullanışlı, ekonomik ve sürekli olması, işlem sonucunda iyi kalitede ürün elde edilmesinden dolayı gıda endüstrisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Taşıyıcı malzeme olarak genellikle nişasta, maltodekstrin ve gamlar kullanılmaktadır (Fang ve Bhandar, 2010).

Kitosan, aljinat ve guar zatkı gibi polisakkaritler sodyum kazeinat, peynir altı suyu proteini, soya proteini gibi proteinler de püskürtmeli kurutma yönteminde kaplama materyali olarak kullanılabilir. Ancak suda çözünürlüklerinin düşük olması ve pahalı olmaları bu yöntem için dezavantajdır (Gouin, 2004). Kaplanacak materyal, taşıyıcı sistem ile homojenize edildikten sonra püskürtmeli kurutucuya verilir. Atomize döner başlığı sıcak hava ile temas eden su buharlaşırken, kapsüller kurutulur.

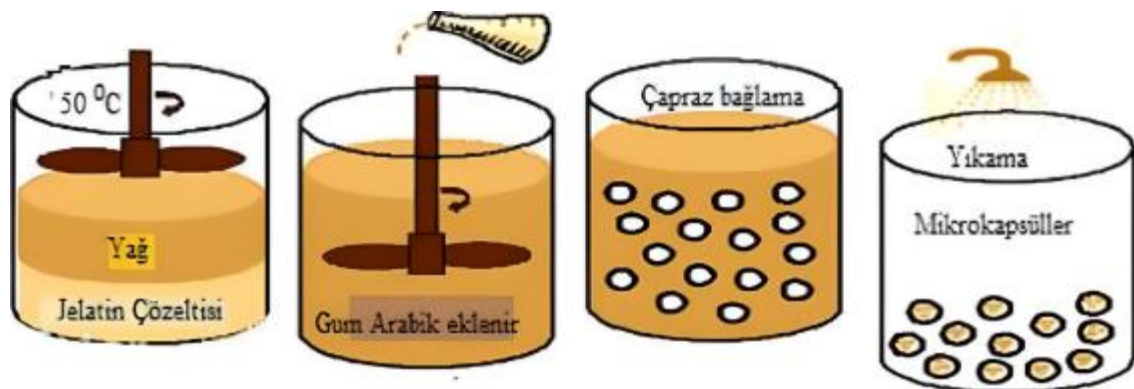


Şekil 7. Püskürtmeli kurutma yönteminin şematize hali (Baltacıoğlu ve Yetişen, 2021).

Bu yöntemde oluşan kapsüllerin boyutları 10 -100 μm aralığındadır. Bu yöntemin dezavantajları ise kullanılan suda çözünebilir kaplama malzemesi çeşitliliğinin kısıtlı olması ve ısıya duyarlı biyoaktif bileşenlerin yüksek sıcaklıklarda kolay bozulmasına neden olmasıdır (Fang ve Bhandar, 2010). Püskürtmeli kurutma yönteminde kaplanacak olan aktif maddeyi içeren bir çözelti veya dispersiyonun, atomizasyon prosesiyle sıcak-soğuk hava akışı ile temas eden damlacıkların kurutulması temeline dayanmaktadır (Gonnet vd., 2010).

1.10.2. Koaservasyon Yöntemi

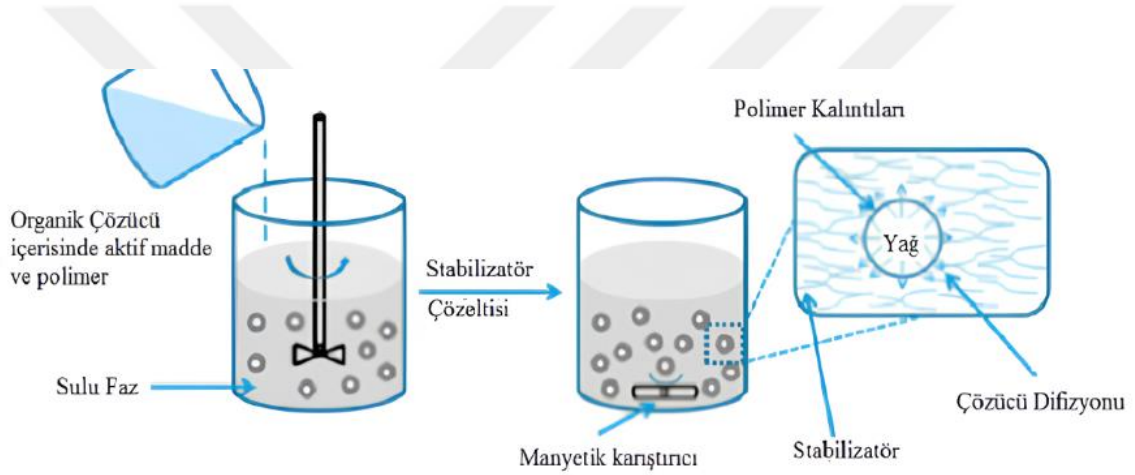
Koaservasyon yöntemi, bir ya da daha fazla hidrokolloidin başlangıç çözeltisinden faz ayrımı ve yeni oluşan koazervat fazın aktif ingrediyen etrafında, aynı reaksiyon ortamında süspanse veya emülsifiye olması yöntemine denir (Fang ve Bhandar, 2010). Koaservasyon yöntemi, aroma yağlarının enkapsülasyon yapımında kullanılan (balık yağı, vitaminler, koruyucular ve enzimler) metottur. Bu yöntemde, jelatin gibi sadece bir kolloid kullanılacağı gibi daha kompleks proseslerde ise jelatin ve gam kombinasyonu da tercih edilebilmektedir (Fang ve Bhandar, 2010). Bu yöntemin diğer enkapsülasyon metotlarına göre avantajlı yönlerinin olmasının yanında ticarileştirilmesinin pahalı olması, karmaşık bir proses olması ve ikincil kabuk materyali olarak pek çok ülkenin yasal düzenlemesinde kullanımı kısıtlı olan gluteraldehit kullanımı gerektirmesi gibi bazı problemler vardır (Gouin, 2004).



Şekil 8. Koaservasyon yöntemi (Keskin, 2018)

1.10.3. Emülsiyon Oluşturma

Emülsiyon, birbirleriyle karışmayan iki fazın (yağ ve su gibi) sıvılardan birinin diğeri içinde çok küçük damlacıklar halinde dağıtılması ile oluşan kolloidal bir yapıdır. Suda çözünür ingrediyeenler su/yağ emülsiyonları veya su/yağ/su gibi çift emülsiyonlar ile enkapsüle edilebilir (Edwards-Lévy, vd., 2011). Oluşan damlacıkların çapları genellikle 0,1-100 µm aralığındadır. Karışımındaki yağ damlacıklarının sulu fazda dağıtıldığı sistemler suda (yağ/su) emülsiyon, su damlacıklarının yağ fazında dağıtıldığı sistemler ise yağda su (su/yağ) emülsiyonu olarak adlandırılır. Bunun yanında, çok katmanlı emülsiyonlar elde etmek de mümkündür. Emülsiyonların stabilitesini arttırmak için bazı emülgatörler de kullanılabilir. (Fang ve Bhandar, 2010).



Şekil 9. Emülsiyon oluşturma yöntemi (Wang vd., 2016).

Beta karoten, steroller ve yağda çözünen vitaminler yağ/su emülsiyonları oluşturularak veya kapsülasyon tekniklerinden püskürtmeli kurutma, dondurarak kurutma yöntemleriyle kurutulup toz halinde gıdalara eklenebilmektedir. Başlangıçtaki damlacıkların konsantrasyonu ve büyüklüklerinin dağılımı kullanılan emülgatöre bağlı olarak değişmektedir. Emülgatör seçilirken, çevresel tepkileri yükü, kalınlığı arayüz özellikleri önemlidir.

1.10.4. Dondurarak Kurutma Yöntemi

Dondurarak kurutma, liyofilizasyon olarak da bilinen ısıya duyarlı bileşenlerin ve aromaların dehidrasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Numuneler -90 ile -40°C'ye dondurulur. Düşük basınç ile düşük sıcaklık altından süblimleşme yoluyla kurutulur. Yapılan bu yöntemde, aktif bileşen ve taşıyıcı malzeme suda çözünür ve porlu yapıda dondurarak kurutulmuş olan ürünler elde edilir.

Dondurarak kurutmanın dezavantajlarında işlem süresinin uzun olması ve ayrıca yüksek enerji kullanımı gerektirmesi, pahalı bir yöntem olması (püskürtmeli kurutmadan 30-50 kat pahalı) ve en önemlisi de kapsüllerin açık delikli yapılardan oluşmasından dolayı iyi bariyer özelliği taşıyamamasıdır (Zuidam ve Shimoni, 2010). Fakat, doğal aromalar ve ilaçların enkapsülasyonu için ısıya duyarlı basit bir teknik olmasından dolayı avantajı nedeniyle tercih edilmektedir (Fang ve Bhandar, 2010).

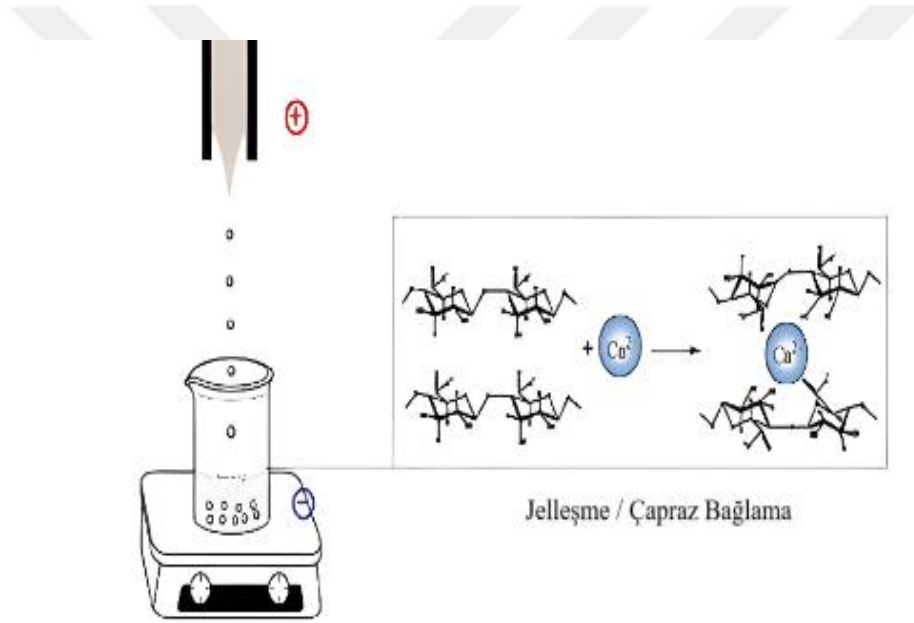
1.10.5. İyonik Jelasyon (Damlatma) Yöntemi

İyonik jelasyon veya damlatma olarak da adlandırılan bu metod pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Jelasyon yönteminde, enkapsülant, aktif bileşen ile homojen bir şekilde karıştırılır. Ardından şırınga yardımıyla dağıtıcı faza (örneğin CaCl_2 çözeltisi) damlatılır. Bu işlemten sonra küresel jel partikülleri elde edilir ve kapsülasyon oluşmaya başlar. Bu yöntem, özellikle kalsiyum-aljinat taneciklerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum iyonlarının CaCl_2 çözeltisinden, sodyum iyonlarının ise Na-aljinat molekülünden çapraz bağlanmasıyla oluşur.

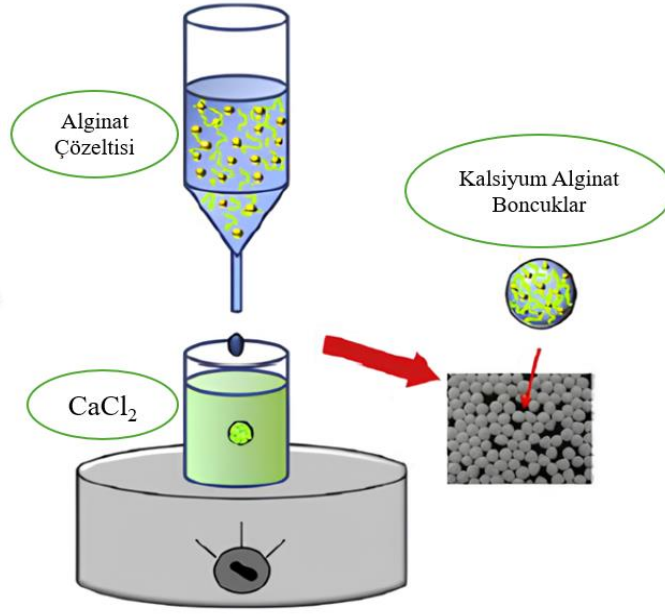
Bu mekanizma, kalsiyum ve sodyum iyonları arasındaki etkileşim ile oluşmaktadır. Aljinat yerine pektin çözeltisinin kalsiyum çözeltisine, peynir altı suyu proteininin sıcak sıvıya, kitosan çözeltisinin tripolifosfat çözeltisine damlatılması veya jelatin çözeltisinin soğuk sıvıya damlatılmasıyla da benzer şekilde kapsül oluşabilmektedir. İyonik jelasyon yöntemi, farklı biyopolimer çözeltileri kullanılarak çeşitli çapraz bağlanma süreçleri ile kapsülleme işlemleri yapılmasına olanak tanır (Matalanis vd., 2011). Şekil 10 ve 11' de yöntem anlatılmaktadır.

Damlatma yöntemi, neredeyse tüm ingredienlerin bu metotla enkapsüle edilmesi gibi özelliklerinin yanında, ayrıca ısıya duyarlı, akışkan olması tercih sebebidir. Bu yöntemin avantajlarının yanı sıra, bu yöntemde yüksek ölçekli miktarlarda kapsül elde etmek, prosesi büyütmek oldukça zor ve maliyeti yüksek ölçeklerdedir.

Gelişen teknoloji ile şırınga-ekstrüzyon sistemi gibi bazı teknolojiler sayesinde gıda ingrediyei içeren aljinat taneciklerinin ticarileşmesinin mümkün olduğu belirtilmiştir (Gouin, 2004). Kapsüllerin üretilmesinde konsantrasyon genelde %0,6–3 aralığında kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltisi 0,05 – 1,5 M olarak hazırlanmaktadır (Nualkaekul vd., 2012). Kalsiyum seviyesinin yüksek olması durumunda çökelme veya jelasyon oluşumu gözlenir. Taneciklerin etkinliğini etkileyen parametreler; moleküler büyüklük, jel oluşturma kapasitesi, biyoyumluluk, kimyasal yapısı gibi faktörlerdir (George ve Abraham, 2006).



Şekil 10. Kalsiyum-aljinat çapraz bağlanma mekanizması (Shi vd., 2011).



Şekil 11. İyonik jelasyon yöntemi (Li vd., 2011).

1.11. Enkapsülasyonda Kullanılan Kaplama Materyalleri

Enkapsülasyon işlemlerinde kullanılan kaplama materyalleri genellikle toksik olmayan, çevre dostu özelliklere sahip ve biyouyumlu olmasının yanı sıra, kaplama materyalleri kapsüllerdeki aktif bileşenleri ışık, nem gibi çevresel faktörlerden korur ve aynı zamanda kontrollü salınımlarını sağlamaktadır. Biyobozunabilir materyal kullanılması, çevreye zarar vermemesi açısından önemli bir noktadır. Kapsülasyon işleminde kullanılacak materyalin jel oluşturma kapasitesi, çözünürlüğü gibi faktörler, kullanılacak yöntemle göre değişiklik gösterebilir. Kaplama materyali olarak kullanılan en yaygın örnekler polisakkaritler (pektin, aljinat) ve lipidler (fosfolipitler) olarak öne çıkmaktadır (McClements, 2009).

1.11.1. Pektin

Pektin, yapısal ve işlevsel olarak bitki hücre duvarlarındaki en karmaşık polisakkarit olarak bilinir. Yapısı, α -(1-4)-bağlı D-galakturonik asit ve 1,2-bağlı L-ramnoz birimlerinden meydana gelmektedir (Vos vd., 2019). Pektinin bitki büyümesi, morfolojisi, gelişimi ve bitki savunmasında işlevleri vardır. Bu polisakkarit, çeşitli gıda ve özel ürünlerde jelleştirici ve

stabilize edici bir polimer olarak hizmet eder. İnsan sağlığı ve çoklu biyomedikal kullanımlar üzerinde olumlu etkileri vardır. Ayrıca odunsu dokudaki ksilem ve lif hücreleri de dahil olmak üzere ikincil duvarlı hücreler arasındaki birleşme bölgesinde ihtiva etmektedir. Karboksil gruplarının yüzdesi pektinin esterifikasyon (karboksilik asit ile bir alkolün veya fenol bileşiminin ısı ve katalizör eşliğinde tepkimeye girerek ester oluşturmaları) derecesini belirtir. Düşük metoksilli pektin, esterifikasyon oranı %50'nin altında olup kalsiyumla jel oluşturma kapasitesine sahip bir yapıdır (Sriamornsak, 1999). Pektin maddesi mide ve ince barsak bozulmadığından, hedef taşıyım sistemlerinde kullanımı uygundur. Pektinin sudaki çözünürlüğü yüksek olduğu için, katyon ve kitosan gibi polimerler ile beraber kombine halde, yavaş bozulması olması sağlanarak kullanılır (Vos vd., 2010).

1.12. *in vitro* Gastrointestinal Sistem

Vücudumuzda sindirim, besinlerin alınımıyla beraber ağızda başlayıp, anüse kadar devam eden bir sistemdir. Tükettiğimiz besinlerin vücudumuzda kullanılabilir hale gelmesi için gerekli olan enzim, hormon, besin sindirimi ve emilimi gastrointestinal sistemi bir araya getirmektedir. Sindirim iki ana mekanizma olmak üzere ağızda çiğneme ile başlar. Mekanik sindirim ağızda çiğneme ve mide-barsak hareketleri olurken, kimyasal sindirim de mekanik olarak parçalanmış besinlerin tükürük, mide asitleri, safra enzimleri ile değişime uğrayarak barsak epitelinden dolaşıma geçebilecek forma dönüşebilen bir süreçtir (Tablo 3). Farklı pH'lara sahip olan sindirim sistemine mide sıvısı asidik, bağırsak sıvısı bazik ortam olarak örnekler verilebilir.

Tablo 3. Sindirim sistemindeki bölgeler ve pH değerleri

Anatomik Bölge	Gıda Kalış Süresi	pH
Ağız	1 dakikaya kadar	~ 6,5- 7,5
Mide Girişi	30-60 dakika	~ 4,0-6,5
Mide	1-3 saat	~ 1,5- 4,0
Duodenum	30-60 dakika	~ 7,0- 8,5
İnce barsak	1-5 saat	~ 4,0- 7,0
Kalın barsak	10 saat veya birkaç gün	~ 4,0- 7,0

Oluşturulan kapsüllerin sindirim sistemindeki davranışları görmek *in vitro* sindirim sistemi ortamları oluşturulur ve pH değerlerine bakılır. Değişen pH değerleri örneğin mide sıvısı için pH 1,5 ve bağırsak sıvısı için pH 6,8-7,4 olacak şekilde, sindirim sisteminin şartlarını taklit ederek kapsüllerin ortamdaki salınım özellikleri değerlendirilir (McClements vd., 2010).

1.13. Antioksidanlar

Oksidasyonu azaltan veya ortadan kaldıran moleküllere antioksidan, ortaklanmamış elektron taşıyan moleküllere ise serbest radikaller denilmektedir. Vücutta serbest radikal türlerinin birikmesiyle hücre hasarı ortaya çıkabilmektedir. Bu hasarda kalp hastalıkları, kanser, yaşlanma gibi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Yetersiz beslenme, çevresel faktörler, enfeksiyon ve kimyasal maruziyet gibi etmenler serbest radikal üretimini artırarak oksidatif stresi arttırmaktadır. Antioksidanlar, bu radikallerin ortaya çıkarabilecekleri hasarlardan koruyarak, genel sağlık durumunu iyileştirebilir (Gulcin, 2020). Bu yüzden, çevresel faktörlere ve dengeli beslenmeye dikkat edilmesi gerekmektedir.

Canlılık, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki mücadelenin bir sonucudur ve canlılardaki antioksidanları iki grupta incelenir. Endojen antioksidanlar, vücutta doğal üretilen ve oksidatif stresi önlemek için görev yapan bileşiklerdir. Serbest radikalleri nötral hale getirmek için enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenler olarak görev yaparlar. Örneğin, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler endojen enzimlerdir (Gupta, 2018). Eksojen antioksidanlar, dışarıdan alınan besinlerle sağlanır. Genellikle vitamin C ve E, meyve, sebze ve birçok besin maddesinde bulunmaktadır (Gulcin, 2020).

1.14. Antioksidan Tayin Yöntemleri

Ekstraksiyonların antioksidan özelliklerini tayin etmede çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerde, oksidasyon ürünlerinin etkilerinin ortadan kaldırılması, temizlenmesi veya oksidasyon ajanlarının indirgenmesi temeline dayanmaktadır.

Antioksidan kapasite yöntemi seçilirken analiz koşulları, substrat ve antioksidan konsantrasyonu gerçek gıda veya biyolojik sistemleri mümkün olduğunca taklit etmelidir. Toplam antioksidan değeri hem hidrojen atomu transferi hem de elektron transferi mekanizmasının benzerlik ve farklılıklarına göre hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlar için geçerli yöntemleri içermelidir (Karadag, 2009).

1.14.1. Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini

Oksijen radikallerini temizleme kapasitesine sahip bileşenlerden biri fenolik bileşenlerdir. Fenolik radikallerin elektron indirgeme potansiyeli, oksijen radikallerine göre daha düşüktür. Toplam fenolik madde miktarının ölçülmesinde kolorimetrik yöntemler özellikle gıda ve biyolojik örneklerde yaygın olarak tercih edilmektedir. Folin-Ciocalteu reaktifi ile reaksiyona girip, spektrumun görünür kısmında renk oluşturur. Böylece elde edilen absorbans değerlerinden yapılan hesaplamalarla besinlerdeki antioksidan kapasitesi belirlenebilir (Prior vd., 2005).

Toplam flavonoid madde tayini, alüminyum klorür ($AlCl_3$) kullanılarak yapılan bir yöntemdir. Polifenoller arasındaki en yaygın bileşikler flavonoidler olup, birden fazla fenol grubuna sahiptirler. Fukumoto ve Mazza (2000) tarafından yapılan yöntemle, Al (III) ile flavonoidlerin şelat oluşumuyla 415 nm'de absorbans vermesine dayanan bir yöntemdir. Flavonoidler, koşullara bağlı olarak Al(III) gibi metal iyonlarına yüksek afinite ile bağlanma eğilimindedir (Kasprzak vd., 2015).

1.14.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç-FRAP

Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç (FRAP) yöntemi, bir örnekteki toplam antioksidan kapasitesini ölçen analitik bir tekniktir ve özellikle düşük moleküler ağırlıklı, suda çözünebilen antioksidanların tespiti için yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem, antioksidan bileşiklerin, demir (III) iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme yeteneklerine dayanır. İlk aşamada, ferrik iyonlar, antioksidanlar tarafından indirgenerek demir (II) iyonlarına (Fe^{2+}) dönüşür. Bu dönüşüm, belirli bir pH ortamında, demir (II) iyonlarıyla reaksiyona giren ve mavi renkli bir kompleks oluşturan 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ile tetiklenir. Elde edilen Fe^{2+} -TPTZ kompleksi, 593 nm dalga boyunda maksimum absorbansa sahiptir (Oyaizu, 1986; Benzie ve Strain, 1999) ve bu absorbans değeri, örneğin antioksidan kapasitesinin bir ölçütü olarak kullanılır. Test örneği ile bilinen bir standardın (genellikle troloks, $FeSO_4$, askorbik asit gibi) absorbans farkı, örnekteki toplam antioksidan kapasitesini hesaplamak için kullanılır.

1.14.3. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

DPPH• yöntemi, farklı bileşiklerin serbest radikal temizleyici veya hidrojen donörü olarak hareket etme kabiliyetini ölçmek ve yiyecek-içeceklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için hızlı, basit, doğru ve ucuz bir testtir (Prakesh, 2001). DPPH• yöntemi, radikal süpürme aktivitesi için birçok örneğin taranması için örnek polaritesinden bağımsız, basit, hızlı ve kullanışlı bir yöntem olarak bilinmektedir (Marxen vd., 2007). DPPH• yöntemi, antioksidanların serbest radikal süpürme yeteneğinin ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2008). Ölçümlerde 517 nm alınan değerlerin absorbanlarında azalma olması beklenir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 4’ de verildi.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka/model bilgileri

Cihaz Adı	Marka / Model
UV-Vis spektrofotometre	Spectro UV-Vis Double Beam PC LaboMed Inc., Los Angeles, USA
HPLC-PDA	Shimadzu Corporation LC 20AT- SPD M30A
Hassas terazi	Presica LX 320 A, Dietikon, İsviçre
pH metre	Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre
Saf su cihazı	Direct-Q 3UV Water Purification System, Merck, USA
Vorteks karıştırıcı	Labnet VX100, MO BIO Laboratories, Inc., NJ, USA
Etüv	Nüve, EN 400, Ankara, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR HEI-Standard, Schwabach, Almanya
Rotary evaporatör	IKA®-Werke, RV 05 Basic, Staufen, Almanya
Vakum Pompası	Buchi Vacuum Pump V-700, Flawil, İsviçre
Yarı otomatik pipetler	Eppendorf Research® Plus Hamburg, Almanya
Filtre	Whatman Spartan 13/ 0,45 RC Dassel, Almanya
Sprey kurutucu	Buchi Mini Spray Dryer B-290, Flawil, İsviçre
Dondurarak kurutma cihazı	Operon Fdu & Fdb, Kore

2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 5’ de verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan kimyasalların isimleri ve bilgileri

Kimyasal isimleri	Satın alınan firma
Gallik Asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Apigenin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

Tablo 5'in devamı

Ramnetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Luteolin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kuersetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>m</i> -OH benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Krisin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Ellagik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kurkumin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Metanol-LC saflıkta	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Etanol	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Resveratrol	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Şiringik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kafeik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Daidzein	Cayman Chemical, Michigan, ABD
<i>t</i> -Sinnamik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Epikateşin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Hesperetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Rutin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Pinosembrin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -kumarik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kafeik asit feniletil ester	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kurkumin	Alfa Aesar, Massachusetts, ABD
Myrisetin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetonitril-LC saflıkta	Merck, Darmstadt, Germany
Ferulik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Asetik Asit	Merck, Darmstadt, Germany
Etil asetat	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Al(NO ₃) ₃	Merck, Darmstadt, Germany
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
NH ₄ CH ₃ COO	Carlo Erba Reagent, Fransa
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, Germany
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

Tablo 5'in devamı

Laktik asit	Tito, Smart Kimya, İzmir
TPTZ	Merck, Darmstadt, Germany
Prolin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Kolin Klorür	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Monopropilen glikol	Tito, Smart Kimya, İzmir
Lesitin	Gemici Gıda Tic. Ltd.
DPPH	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Troloks	Applichem, Darmstadt, Almanya
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
Sitrik asit monohidrat	Tito, Smart Kimya, İzmir
Askorbik asit	Tito, Smart Kimya, İzmir
Pektin	Tito, Smart Kimya, İzmir
Kalsiyum klorür	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany
<i>p</i> -benzoik asit	Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany

2.3. Kullanılan Çözeltiler

Yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 6'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Çözelti içeriği	Çözeltinin hazırlanışı
HPLC-PDA Fenolik Bileşen Analizi İçin	
Gallik asit, Protokatekuik asit <i>p</i> -OH benzoik asit <i>m</i> -OH benzoik asit Klorojenik asit, Kafeik asit Şiringik asit, <i>p</i> -Kumarik asit, Ferulik asit	%50-50 metanol-saf suda 1000 ppm' lik stok çözeltisi hazırlanır. 1,25- 2,5- 5- 10- 20- 40 ppm olacak şekilde çalışma standartları oluşturmak için çözücüsü (hazırlanan metanol-saf su) ile seyreltme yapılır.

Tablo 6'nın devamı

Epikateşin Rutin Myrisetin Kuersetin Apigenin Resveratrol Daidzein <i>t</i> -Sinnamik asit Hesperetin Luteolin Ramnetin Krisin	%100 metanolle 1000 ppm' lik stok çözeltisi hazırlanır. 1,25- 2,5- 5-10- 20- 40 ppm olacak şekilde standart oluşturmak için çözücüsü metanol ile seyreltme yapıldı.
Ellagik asit	Önce DMSO'da çözüldükten sonra %100 metanolle 1000 ppm'lik çözeltisinin hacmi tamamlanır. 1,25- 2,5- 5 -10-20- 40 ppm olacak şekilde çalışma standartları oluşturmak için çözücüsü metanol ile seyreltme yapıldı.
Pinosembrin CAPE Kurkumin	%100 metanolle 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlanır. 1,25- 2,5- 5-10-20-40 ppm olacak şekilde standart oluşturmak için çözücüsü metanol ile seyreltme yapıldı.
%70-30 Asetonitril-Saf Su	350 ml asetonitril balon jojeye eklendikten sonra saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
Toplam Fenolik Madde Miktarı Testi için	
Gallik Asit	1 mg/mL olacak şekilde metanol ile hazırlanan gallik asit stok çözeltiden, 0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL olacak şekilde metanolle seyreltilerek hazırlandı.
0,2 N Folin-Ciocalteu reaktifi	2N Folin-Ciocalteu çözeltisinden 1:10 oranında saf suyla seyreltilerek kullanıldı.
%10'luk Na ₂ CO ₃	10 g Na ₂ CO ₃ bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL olacak şekilde tamamlandı.
Toplam Flavonoid Madde Miktarı Testi için	
Kuersetin	1 mg/mL olacak şekilde kuersetin metanol ile hazırlandı. Stok çözeltiden 0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL olacak şekilde metanol ile seyreltilme yapılarak çalışma aralığı belirlendi.
%10 Al(NO ₃) ₃	1 g Al(NO ₃) ₃ 10 mL saf suda çözüldü.
1 M NH ₄ CH ₃ COO	7,7 g NH ₄ CH ₃ COO tartılır ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacmi 100 mL' ye olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

Tablo 6'nın devamı

DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Testi için	
Troloks (0,02 mg/ml)	10 mg troloks alınıp 10 mL metanolde çözerek stok çözeltisi hazırlanır ve 0,02 mg/mL'lik çalışma çözeltisi hazırlamak için metanol ile seyreltme yapıldı.
DPPH reaktifi (0,1 mM)	100 mL çözelti hazırlamak için; 3,94 mg DPPH tartılır ve bir miktar metanolde çözülür. Metanol ile 100 mL'ye tamamlandı.
Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç -FRAP Analizi İçin	
HCl (40 mM)	Saf suyun üzerine %37'lik HCl' den 340 µL ilave edildi. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
TPTZ (10 mM)	TPTZ maddesinden stok çözelti için 234,249 mg tartıldı. 75 mL 40 mM'lık HCl ile çözüldü.
FeSO ₄ .7H ₂ O (1000 µM)	27,8 mg FeSO ₄ .7H ₂ O bir miktar saf suda çözüldü. Saf su ile son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. 500, 250, 125, 62,5 ve 31,2 µM'lık konsantrasyonlara saf su ile seyreltildi.
Asetat tamponu (300 mM, pH 3,6)	NaCH ₃ COO.3H ₂ O maddesinden 2,325 g alınıp 12 mL glasiyel asetik asit ilave edildi ve 750 mL'ye saf suyla tamamlandı.
FRAP reaktifi	300 mM pH 3,6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında üç çözelti taze hazırlanarak karıştırıldı. Güneş ışığından etkilenmemesi için etrafı folyo ile sarıldı.
in vitro sindirim metodu	
1 M NaHCO ₃	8,401 g NaHCO ₃ bir miktar saf suda çözüldü. Son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
5 N HCl	Bir miktar saf su üzerine 41,46 mL HCl (%37, d=1,19 g/mL) yavaş bir şekilde eklendi. Hacim saf su 100 mL'ye tamamlandı.
315 U/mL pepsin çözeltisi	10 mL'lik bir pepsin çözeltisini hazırlamak için 727 U/mg'lık pepsinden 4,33 mg alıp 10 mL 0,1 N HCl'de çözündürüldü.
Pektin kapsülleri için	
%3'lük pektin çözeltisi	3 g pektin tartılır, 50 mL saf suda çözülür, 100 mL'ye tamamlandıktan sonra 70°C'de çözülene kadar bekletilir.
0,05 M kalsiyum klorür	5,5 g kalsiyum klorür tartılır, 90 mL saf suda çözülür, 100 mL tamamlanır.

2.4. Çalışılan Numunelerin Temin Edilmesi ve Saklanması

Propolis örnekleri, 1505 Teydep projesi kapsamında yürütülen proje ortağı SBS Bilimsel Bioçözümler Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi tarafından temin edildi. Türkiye'nin 7 farklı coğrafik bölgesinden toplanan ham propolis örnekleri eşit miktarda karıştırılmak suretiyle Anadolu propolisi örneği oluşturuldu. Bunun için her bir propolis örneği öğütüldü ve bir propolis havuzu olacak şekilde karıştırıldı. Homojen bir Anadolu propolisinden 2 kg olacak şekilde hazırlanan homojen karışım kullanılmak üzere derin dondurucuda (-18°C 'de) saklandı. Bütün çalışmalar bu örnek üzerinden yürütüldü.

2.5. Etanolik Propolis Özütlerinin Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan 3 gram ham propolis üzerine 30 mL %70'lik etanol ilave edildikten sonra önce vorteks ile 2 dakika karıştırıldı, sonra iki saat kadar ultrasonik banyoda özütlendi. Daha sonra 24 saat 180 rpm'de çalkalama işlemi için karıştırıcıya konuldu. Çalkalama işlemi bittikten sonra önce adi süzgeç kağıdından filtre edildi. Süzülen ekstrakt tekrardan mavi süzgeç kağıdından süzülerek safsızlıklar ve kalabilecek partiküller giderildi. Hazırlanmış olan ekstrakt, çalışma yapılıncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (Şekil 12).



Şekil 12. Stok etanolik propolis ekstraktı

Stok etanolik propolis özütü aynı propolis ve etanolik miktarları üzerinden fazla miktarda hazırlanmak suretiyle stok özütler hazırlandı. Hazırlanan propolis stok çözeltisinden gerekli hacimde alınarak analizler ve diğer çalışmalar yapıldı.

2.6. Sulu Propolis Özütünün Hazırlanması

Bu çalışmada ham Anadolu propolisinin sadece sulu özütü hazırlanarak bundan sonraki DÖS ve diğer özütleme sonuçlarının yorumlanmalarında kullanıldı. Bunun için etanolik propolis özütlerine benzer prosedür uygulandı. 3 g ham propolis 30 ml saf su ile önce vortekslendi, 2 saat ultrasonik banyoda ve ardından 24 saat çalkalayıcıda bekletildikten sonra gerekli filtrasyonlardan geçerek elde edilen özüt +4 °C’de saklandı.

2.7. Derin Ötektik Solventlerin (DÖS) Hazırlanması

Yapılan bu çalışmada derin ötektik çözücü hazırlamak için kolin klorür, laktik asit, sitrik asit, askorbik asit, L-prolin, monopropilen glikol ve ayrıca sodyum karbonat kullanıldı. DÖS hazırlamak için çok sayıda deneme deseni oluşturuldu. Literatür bilgilerini de kullanarak, en uygun karışım oranları kolin klorür ile birlikte diğer bileşenlerle sırayla 1:1, 1:2, 1:5 ve 1:10 konsantrasyonlar hazırlanarak çalışmalar yapıldı. Yapılan literatür araştırmalarında DÖS hazırlanırken kullanılması gereken su oranının %0-%70 aralığında olması gerektiği belirtilmiştir (Popovic vd., 2022). Propolis için 4 farklı aralıkta kolin klorür ve laktik asit içeren bir DÖS hazırlamak için yapılması gerekenler şu şekildedir;

- A. 1:1 kolin klorür+laktik asit için; 3 g kolin klorür ile 3 mL laktik asit karıştırıldıktan sonra 50 mL’ye saf su ile tamamlandı. 2,5 saat süre ile 70-80 °C’de bekletildi. Hazır olan 1:1 CC+LA karışımından 15 mL alınarak, içerisine 1 g olacak şekilde propolis eklendi. 2 saat ultrasonikasyonda bekledikten sonra 24 saat çalkalama ve süzme işlemi yapıldı.
- B. 1:2 kolin klorür+laktik asit için; 3 g kolin klorür ile 6 mL laktik asit karıştırıldıktan sonra 50 mL’ye saf su ile tamamlandı. 2,5 saat süre ile 70-80 °C’de bekletildi. Hazır olan 1:2 CC+LA karışımından 15 mL alınarak, içerisine 1 g olacak şekilde propolis eklendi. 2 saat ultrasonikasyonda bekledikten sonra 24 saat çalkalama ve süzme işlemi yapıldı.

- C.** 1:5 kolin klorür+laktik asit için; 3 g kolin klorür ile 15 mL laktik asit karıştırıldıktan sonra 50 mL'ye saf su ile tamamlandı. 2,5 saat süre ile 70-80 °C'de bekletildi. Hazır olan 1:5 CC+LA karışımından 15 mL alınarak, içerisine 1 g olacak şekilde propolis eklendi. 2 saat ultrasonikasyonda bekledikten sonra 24 saat çalkalama ve süzme işlemi yapıldı.
- D.** 1:10 kolin klorür + laktik asit için; 3 g kolin klorür ile 30 mL laktik asit karıştırıldıktan sonra 50 mL'ye saf su ile tamamlandı. 2,5 saat süreyle 70-80 °C'de bekletildi. Hazır olan 1:10 CC+LA karışımından 15 mL alınarak, içerisine 1 g olacak şekilde propolis eklendi. 2 saat ultrasonikasyonda bekledikten sonra 24 saat çalkalama ve süzme işlemi yapıldı.

Hazırlanan numuneler, aynı şekilde diğer kullanılan sitrik asit, askorbik asit, L-prolin, monopropilen glikol maddeleriyle kolin klorür oranları 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 olacak şekilde hazırlandı ve propolis özütlemeye kabiliyetleri toplam fenolik madde miktarı üzerinden değerlendirildi. Şekil 13' de hazırlanan DÖS çözeltilerinden bir fotoğraf gösterildi.



Şekil 13. Hazırlanan derin ötektik solventler

2.8. Propolisin Sulu Ortamdaki Alkali Ekstraksiyonu

DÖS solventlerinden birini kullanmadan sadece ortamın pH' ına bağılı olarak propolis özütlemesi yapıldı. Alkali ortam oluşturmaları için sodyum karbonat kullanıldı. Propolisin alkali ortamdaki çözünürlüğü için 6 farklı konsantrasyonda çalışma yapıldı. Sodyum karbonat ile hazırlanan propolislerin yenilebilir bir asit ile pH asidik ortam olacak şekilde ayarlandı. %0,1, %0,4, %0,8, %1, %1,5, %2 Na_2CO_3 konsantrasyonlarında hazırlandı (Şekil 14). 3 g propolis tartılıp, hazırlanacak sodyum karbonat konsantrasyonu için eklememiz gereken Na_2CO_3 tartılıp eklendikten sonra saf su ile 30 mL'ye tamamlandı. Değişen oranlarda sodyum karbonat ile yapılan ekstraksiyonlarda sulu faza geçen fenolik madde miktarı ve diğer antioksidan testleri yapıldı.



Şekil 14. Propolis-sodyum karbonat ekstraksiyonları

2.9. Propolisin Bitkisel Yağlar ile Ekstraksiyonu

Propolis yağda çok az çözünün bir materyal olup, yağdaki çözünürlüğünün artırılması için bu çalışmada farklı uygulamalar yapıldı. Bu amaçla fındık yağı, zeytinyağı, ayçiçek yağı ve susam yağı ile ekstraksiyonlar hazırlandı. Çalışmalar iki şekilde uygulandı. Ham propolis + yağ, ham propolis + yağ + lesitin ile yapılan çalışmalar ve etanolik propolis özütü + yağ + lesitin ile yapılan çalışmalar olarak değişik deneme desenleri uygulandı. Ham propolis ve

bitkisel yağ ile yapılan çalışmalar da elde edilen özütün süzme -filtrasyon işlemleri çok zor ve elde edilen ürünün görüntüsü kötü bulunduğu için etanolik propolis özütü ile çalışmalara devam edildi. Hazırlanan %70'lik etanolik propolis özütlerinden alınan 50 mL'lik örnekler balonlara eşit hacimlerde konuldu. Alkol açısından kuruluğa yakın vakumda alkolün uzaklaştırılması için evapore edildi (Şekil 15) ve çözücüsüz propolis özütüne lesitin ile bitkisel yağ ilave edilmek suretiyle özütlemeler yapıldı. Değişik oranlarda kullanılan yağ:lesitin:propolis özütlerinde toplam polifenol analizi için oda sıcaklığında saklandı.



Şekil 15. Döner buharlaştırıcıda organik çözücülerden uzaklaşan yağ-propolis ekstraktı

2.10. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

2.10.1. Toplam Fenolik Madde Tayini (TPC)

Toplam fenolik madde analizi yapılırken bazik ortamda indirgenen Folin-Ciocalteu kullanılır. Fenolik bileşenler folin reaktifini indirgerken kendilerini yükseltir. Slinkard ve arkadaşları tarafından belirtilen bu yöntemin esasını, folin reaktifinin oksitleyici ajan görevi görerek fenolikler ile redoks reaksiyon oluşturmalarıdır (Singleton ve Rossi, 1965).

Oluşan bu redoks tepkimelerinin sonucunda 760 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılır ve hesaplamalarla madde miktarı belirlenir. Ölçümlerin sonucunda standart bir kalibrasyon grafiği kullanılarak fenolik madde miktarı hesabı yapılır. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır ve standart 1 mg/mL konsantrasyonundan başlanıp 0,500-0,250-0,125-0,062-0,031-0,015 mg/mL'lik çözeltiler hazırlandı. Standart grafiğini çizip, absorbansı

okuduğumuz örnekler ile karşılık gelecek absorbansa göre hesaplama yapıldı. Sonuçlar mg gallik asit eş değeri olarak hesaplanmıştır. Tablo 7’de yapılan analizdeki pipetlemeler verildi.

Tablo 7. Toplam fenolik madde analiz metodu

	Kör	Standart	Örnek
Saf su	700 µL	680 µL	680 µL
Standart / Gallik asit	-	20 µL	-
Propolis özüt	-	-	20 µL
0,2 N Folin reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vortekslenir ve 3 dk beklenir			
%10 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vortekslenir. 120 dk inkübasyondan sonra 760 nm’de okunur			

2.10.2. Toplam Flavonoid Madde Tayini

Antioksidan tayinlerinden biri olan toplam flavonoid madde miktarını belirlemek için Fukumoto ve Mazza tarafından yapılan metod kullanıldı. Alüminyum ile flavonoidler arasında oluşan redoks tepkimesinin sonucunda ortaya çıkan renkli ürünün absorbansının 415 nm’de ölçülmesine dayanmaktadır (Fukumoto ve Mazza, 2000). Standart olarak kuersetin 1 mg/mL kullanıldı. Kullanılan standarda ait kalibrasyon grafiğinden ölçülen numunelerin absorbansına karşılık gelen değer alınarak hesap yapıldı. 1 mg/mL kuersetin stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu standarttan 0,500, 0,250, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015 mg/mL’lik seyreltme yapıldı. Sonuçlar gram örnek başına mg kuersetin eşdeğeri olarak verildi. Deneyde yapılan metod Tablo 8’ de verildi.

Tablo 8. Toplam flavonoid madde tayini metodu

	Reaktif körü	Renk körü	Standart	Örnek
Propolis özütü	-	250 µL	-	250 µL
Standart	-	-	250 µL	-
Metanol	2400 µL	2250 µL	2150 µL	2150 µL
%10 Al(NO ₃) ₃	50 µL	-	50 µL	50 µL
1M NH ₄ CH ₃ COO	50 µL	--	50 µL	50 µL
Her bir tüp vortekslendikten sonra 40 dk inkübasyon sonunda 415 nm’de okunur				

2.10.3. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Tayini

Antioksidan aktivite tespiti için sıklıkla kullanılan bu metod, Fe(III)-TPTZ kompleksinin antioksidan içeren bir numuneye eklenmesiyle birlikte oluşan mavi renkli çözeltinin oluşması metoduna dayanır. Gerçekleşen tepkimeyle oluşan Fe(II)-TPTZ kompleksi, 593 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir (Benzie and Strain, 1999). Metodu uygularken kullanılan FRAP reaktifi 10:1:1 oranında 300 mM pH:3,6 asetat tamponu, 20 mM FeCl₃ ve 10 mM TPTZ çözeltileri karıştırılarak taze hazırlandı. Hesaplamalarda kullanılacak standart kalibrasyon grafiği için FeSO₄.7H₂O kullanıldı. Kullanılan stok çözelti 1000 µM olarak hazırlandı ve seri seyreltme işlemi yapıldıktan sonra standart çalışma çözeltileri elde edildi. Deney bittikten sonra ortaya çıkan absorbans değerleri, standart grafiğindeki absorbansa karşılık gelecek değerlere göre hesaplamalar yapıldı. Hesaplamalar FeSO₄.7H₂O’nın eşdeğeri olarak hesaplandı. Yapılan analizde kullanılan miktarlar Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Demir (III) indirgeme antioksidan güç-FRAP tayini

	Reaktif körü	Renk körü	Standart	Örnek
FRAP reaktifi	1500 µL	-	1500 µL	1500 µL
Örnek	-	50 µL	-	50 µL
Standart	-	-	50 µL	-
Metanol	50 µL	1500 µL	-	-
Her bir tüp vortekslendikten sonra karanlıkta 4 dk inkübasyona bırakılır ve 593 nm’de ölçülür.				

2.10.4. DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analizi

Sentetik olarak üretilen DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, örneklerde bulunan bileşenlerin radikal temizleme aktivitesini belirlemek için kullanılır. 100 µM'lık stok çözeltisi metanol kullanılarak hazırlandı. Bu analizde DPPH• radikal konsantrasyonu ortamda sabit tutulurken seri seyreltme ile elde edilmiş standart çözeltileri eklendi. DPPH• radikali 1:1 oranında karıştırılarak spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Ölçülen değerler ile üstel bir grafik çizilerek SC₅₀ değeri hesaplandı. Numunelerin karşılaştırılması için DPPH• radikalini temizleme gücü olan Troloks kullanıldı (Cuendet, 1997).

Tablo 10. DPPH• radikal temizleme aktivitesi tayini

	Reaktif körü	Renk körü	Örnek
Örnek	-	750 µL	750 µL
Metanol	750 µL	750 µL	-
DPPH•	750 µL	-	750 µL
Her bir tüp vorteksledikten sonra karanlıkta 40 dk inkübasyona bırakılır ve 517 nm'de ölçülür.			

2.11. RP-HPLC-PDA ile Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

2.11.1. RP-HPLC-PDA Analiz Koşulları

Çalışmalarımız Fotodiyot (PDA) kullanılarak 26 adet fenolik standart ile valide edilen yöntem kullanılarak yapıldı (Kara ve Birinci, 2024). Fotodiyot (PDA) dizisi dedektörleri, UV dedektörlere kıyasla 200-800 nm'de bir ya da iki dalga boyunda analiz yapmamıza imkân sunan bir teknolojidir. Çalışma esnasında hareketli faz için asetonitril, su ve asetik asit gradiyenti program kullanıldı. Sabit faz olarak ters faz C₁₈ (250 mm x4.6 mm, 5µm; GL Sciences) kolonu kullanıldı. A rezervuarında %70-30 asetonitril-ultra saf su; B rezervuarında %2'lik asetik asitli ultra saf su gradiyenti uygulandı. Kolon fırını 30 °C, enjeksiyon hacmi 20 µL, mobil akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlandı.

Propolis özütlerindeki fenolik bileşen analizi yapılmadan önce sıvı-sıvı ekstraksiyon ile zenginleştirme işlemi yapıldı. Bunun için 10 mL özüt solventi 40 °C'de döner

buharlaştırıcı yardımıyla alkolü uzaklaştırıldı. 10 mL pH'sı 2'ye HCl ile ayarlanmış olan saf suda yeniden çözülerek asidik hidroliz uygulandı. Daha sonra 10 mL dietil eter ile beraber muamele edildi ve çalkalayıcı da 15 dakika 200 rpm'de oda sıcaklığında bekletildi. Çalkalama işlemi bittikten sonra üst organik faz darası alınmış bir balona aktarıldı. Aynı işlem tekrar 5 mL dietil eter ile yapıldı. Daha sonra 10 mL etil asetat ile 15 dk 200 rpm'de karıştırıldı. Organik faz aynı balona eklendi. 5 mL etil asetat ile tekrar aynı işlem yapıldı. Bütün organik fazlar darası alınmış balonda toplandıktan sonra, organik kısmı döner buharlaştırıcıda 40 °C'de uçurulma işlemi yapıldı. Uzaklaşan organik çözücünden kalan kısma 2 mL metanol eklenerek vorteksleme işlemi yapıldı. Metanolle çözünen numune 0,45 µm filtreden geçirildikten sonra HPLC cihazına fenolik analiz tayini için verildi.

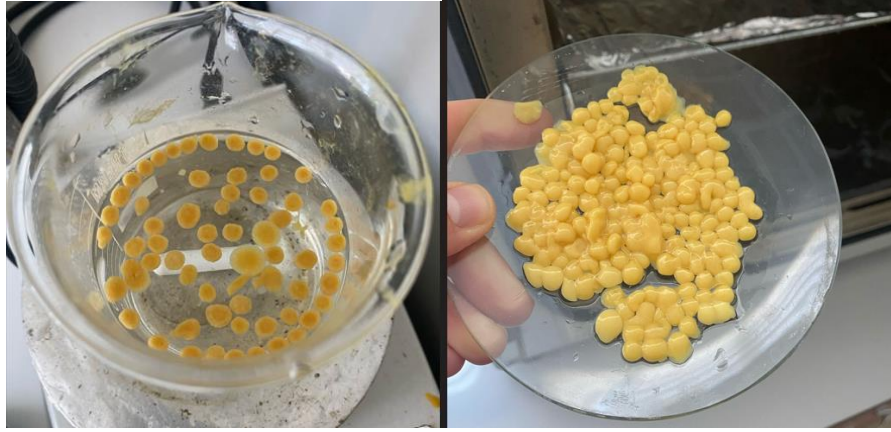
2.11.2. Validasyon ve Kalibrasyon

Çalışmada kullanılan 26 adet fenolik standart için ayrı ayrı çözücüsünde stok çözeltiler hazırlandı. Stok çözeltilerden çalışma çözeltileri için 1,25/ 2,5/ 5/ 10/ 20/ 40 ppm'lik çözeltiler elde edildi. Daha sonra standartlara ait kalibrasyon grafikleri elde edildi. Validasyon için yapılan metodun kesinliği, doğruluğu, tayin limiti, ölçüm aralığı, gözlenebilme değerleri hesaplandıktan sonra R^2 değeri hesaplandı. Metodun geri kazanımları ve tekrarlanabilirliği testleri yapıldıktan sonra doğruluğu ve kesinliği belirlendi. Ayrıca gözlenebilme limiti ve tayin limiti belirlendi. Hesaplaması, $LOQ = SD \times 10$ ile tayin limiti, $LOD = SD \times 3$ ile gözlenebilme limiti belirlendi (Kara ve Birinci, 2024).

2.12. Enkapsülasyon Çalışmaları

2.12.1. Propolis-Pektin Kapsüllerinin Hazırlanması

Pektin-propolis kapsülleri Abinden (2011)'in belirttiği yöntemde bazı modifikasyonlar yapmak suretiyle gerçekleştirildi. Farklı konsantrasyonlarda yapılan denemelerde en iyi sonucu veren %3'lük pektin çözeltisi, hazırlanan etanolik propolis çözeltisinden 2 mL alınarak 1:1 oranında pektin ile karıştırıldı. Elde edilen karışım şırınga ile 0,05 M damla damla $CaCl_2$ çözeltisine ilave edildi. 15 dk 120 rpm'de homojen karışım olduktan sonra oluşan kapsüller süzülerek $CaCl_2$ çözeltisinden ayrıldı. Oluşan kapsüller 5 saat boyunca 60 °C'de kuruması için bırakıldı. Kalan süzüntü toplam fenolik madde tayini için saklandı.



Şekil 16. Pektinle iyonik jelasyon

2.12.2. Pektin Konsantrasyonunun Etkisi

Kapsülleme etkinliğine pektin konsantrasyonunun etkisini anlamak amacıyla %1, %2, %3, %4' lük konsantrasyonlarda saf su ile 70 °C'de çözünmesi için 15 dakika bekletildi. Hazırlanan bu konsantrasyonlardan her birinden 2 mL alıp aynı miktarda etanolik propolis özütleri ile karıştırıldı. Karışım şırınga ile 0,05 M CaCl_2 çözeltisi içerisine damlatıldı. Oluşan kapsüller gözlemlenerek konsantrasyon belirlendi. Enkapsülasyon etkinliği hesaplandı.

2.12.3. Enkapsülasyonda Carr İndeksi

Toz bir gıdanın akabilirliği; bir yığın partikülün, etrafındaki partiküllerin arasından veya bir haznenin duvarlarına sürtünerek meydana getirdiği hareket olarak tanımlanmaktadır (Peleg,1977). Carr (1965) toz ürünlerin yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yığın yoğunluklarını kullanarak belirlediği “Carr İndeks (CI)” değerlerine göre; CI değerinin 15'ten küçük olması durumunda akabilirliği çok iyi, 15-20 arasında iyi, 20-35 arasında zayıf, 35-45 arasında kötü, 45'ten büyük ise çok kötü olarak ifade etmiştir. Bu ölçüm, özellikle ilaç endüstrisinde kapsüllenmiş ilaçların kalitesini ve performansını değerlendirmek için önemlidir. Düşük Carr indeksi, ilacın biyoyararlanımını artırabilir ve formülasyonun stabilitesini sağlayabilir. Ayrıca, gıda endüstrisinde de enkapsülasyonun ürün kalitesi ve raf ömrü üzerindeki etkisini değerlendirmede kullanılır.

2.12.4. Enkapsüle Toz Örneklerin Partikül Analizi

Açıklık (span) yığın içindeki partiküllerin dağılımını ifade etmektedir. Toz örneklerde partikül boyutu ölçüm sonuçları ile elde edilen span açıklık değeri, partikül boyut dağılımının genişliğini ifade etmektedir. Partikül boyut dağılımı, örnekteki toz partiküllerinin boyutlarının ne kadar homojen veya heterojen olduğunu gösterir. Büyük bir span değeri, partikül boyutlarının büyük bir aralıkta olduğunu ve dağılımın heterojen olduğunu gösterirken, düşük bir span değeri homojen bir partikül boyut dağılımını ifade etmektedir (Pirozzi vd., 1886).

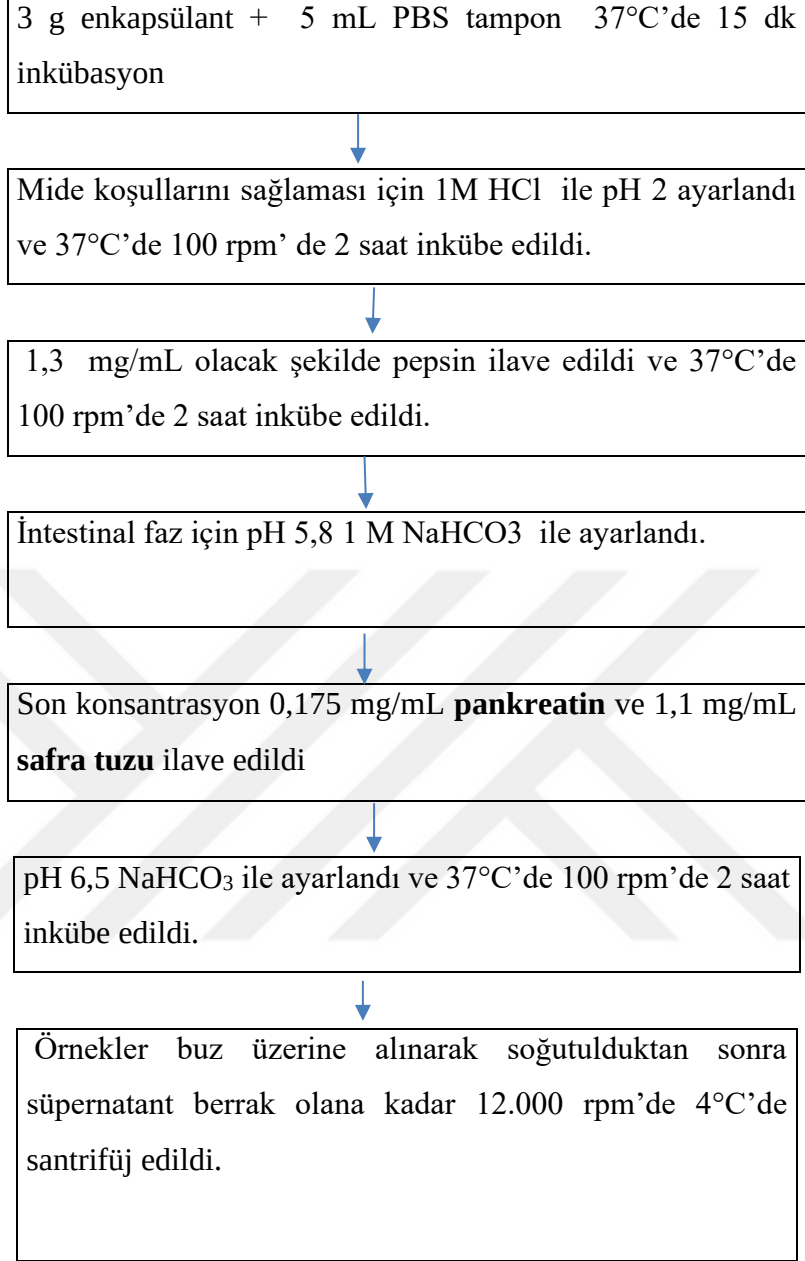
2.12.5. Propolis-Pektin Kapsüllerinin *in vitro* Gastrointestinal Sindirimi

Yapılan çalışma Ozkan vd. (2022) ile Sessa vd. (2011) tarafından verilen yöntem uygulanarak yapıldı (Şekil 17). 1 g enkapsüle edilmiş toz örnek tartıldı. 5 mL PBS (Fosfat tamponlu salin) ile karıştırılarak 37 °C’de 15 dk boyunca inkübe edildi. Mide koşullarının sağlanması için 1 M HCl ile ortamın pH’ı 2’ye ayarlandı. Pepsin konsantrasyonu 1,3 mg/mL olarak hazırlandıktan sonra karışıma ilave edildi. 100 rpm’de 2 saat boyunca 37 °C’de karıştırıldı. İntestinal faz için 1 M NaHCO₃ kullanarak ortamın pH’ı 5.8’e çıkarıldı. Daha sonra ortama son konsantrasyonları 0,175 mg/mL pankreatin ve 1,1 mg/mL safra tuzu ilave edildi. İlaveden sonra 1 M NaHCO₃ ile pH 6.5’e çıkarıldı. Tekrar 100 rpm’de 2 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hemen 10000 rpm’de 30 dk boyunca +4 °C’de santrifügasyon yapıldı Süpernatanta toplam polifenol testi uygulandı. Konsantrasyon 1g/toplam hacim olarak kullanıldı. Biyoerişilebilirlik indekslerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılacaktır.

$$\text{Biyoerişilebilirlik (\%)} = (\text{BC}_{\text{sindirim sonrası}} / \text{BC}_{\text{başlangıç}}) \times 100 \quad (1)$$

$\text{BC}_{\text{sindirim sonrası}}$: *in vitro* sindirim sonucunda elde edilen süpernatantta tespit edilen miktar / aktivite

$\text{BC}_{\text{başlangıç}}$: Sindirim öncesinde tespit edilen miktar / aktivite



Şekil 17. *in vitro* sindirim modeli akış şeması

3. BULGULAR

3.1. Ekstraktların Hazırlanması

Bütün çalışmalar tek bir propolis örneği üzerinden yürütüldü. Propolis ekstraktları +4 °C’de buzdolabında saklandı. Etanolik ve su bazlı propolis çözeltileri karşılaştırma yapmak için referans çözeltilerimizdir.

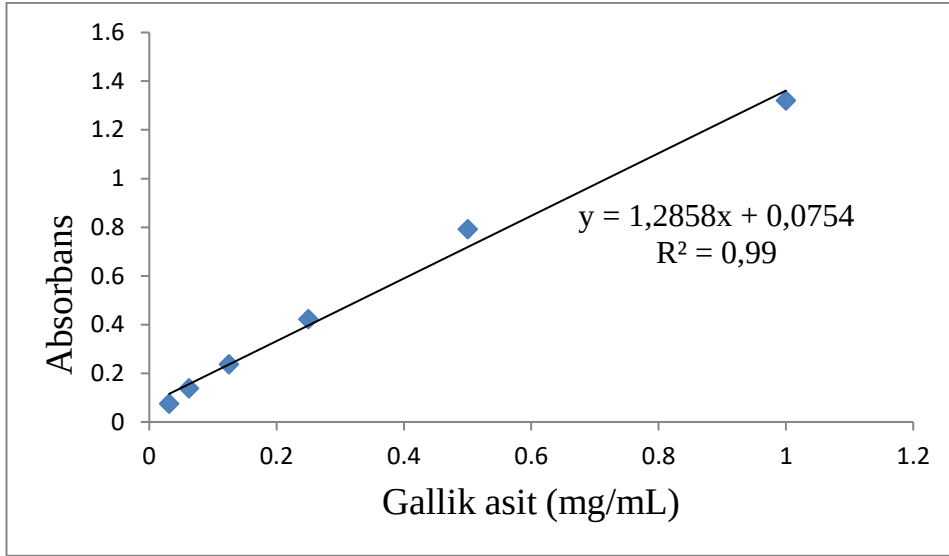
Kolin klorür-prolin, kolin klorür-laktik asit, kolin klorür-sitrik asit, kolin klorür-askorbik asit çözeltileri 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 şeklinde dört farklı konsantrasyonda çalışıldı. Propolisin sodyum karbonatla hazırlanan çözeltisi içinde %0,1, %0,4, %0,8, %1, %1,5, %2 Na₂CO₃ olacak şekilde 6 farklı konsantrasyonda çalışıldı.

Propolis-yağ çalışmasındaki çözeltiler; %70’lik etil alkol ile ekstrakt edildi. Çeşitli bitkisel yağlar ile propolis ekstraktlarının hazırlanması iki şekilde uygulandı. Ham propolis+yağ, ham propolis+yağ+lesitin ile yapılan çalışmalar ve etanolik propolis özütü+ yağ + lesitin ile yapılan çalışmalar olarak değişik deneme desenleri uygulandı. Ham propolis ve bitkisel yağ ile yapılan çalışmalar da elde edilen özütün süzme-filtrasyon işlemleri çok zor ve elde edilen ürünün görüntüsü kötü bulunduğu için etanolik propolis özütü ile çalışmalara devam edildi. Hazırlanan %70’lik etanolik propolis özütlerinden alınan 50 ml’lik örnekler balonlara eşit hacimlerde konuldu. Alkol kuruluğa yakın vakumda evapore edildikten sonra çözücüsüz propolis özütüne lesitin ve bitkisel yağ ilave edilmek suretiyle özütlemeler yapıldı. Değişik oranlarda kullanılan yağ:lesitin:propolis özütü çalışmaları uygulandı.

3.2. Antioksidan Analiz Sonuçları

3.2.1. Standart Çalışma Grafiği

Gallik asit standardına hazırlanan ve Folin yöntemine göre uygulanan standart çalışma grafiği aşağıdaki Şekil 18’deki gibi belirlendi. Yapılan propolis özütlerindeki toplam fenolik madde miktarları bu grafiğe göre belirlendi. Her bir propolis özütü için farklı seyreltme işlemleri yapılarak, çalışma aralığına uygun kantitatif değerlendirmeler yapıldı. Elde edilen değerlendirme sonucu mg GAE/mL cinsinden değerlendirmeler yapıldı.



Şekil 18. Gallik asit standart kalibrasyon grafiği

3.2.2. Derin Ötektik Solvent (DÖS) Çalışmaları

TPC miktarı standart çalışma grafiği kullanılmak suretiyle hazırlanan DÖS ve yağ bazlı propolis özütlerinin hesaplamaları yapıldı. Yapılan çalışmalarda referans propolis ile ölçülen diğer ekstraktlarımızın toplam fenolik madde miktarı karşılaştırıldı. Şekil 18’de verilen standart grafiği, propolis-alkol ekstraktı ve propolis:klorür-laktik asit çözeltilerinin analizinde elde edilen standart grafiğidir. Farklı gün ve zamanlarda yapılan toplam fenolik madde analizinde tekrar standart çalışıp, yeni standart çalışma grafiği hazırlanmak suretiyle hesaplamalar yapılır.

3.2.3. DÖS Çalışmaları

Etanolik propolis özütlerinin yeşil solvent olarak adlandırılan derin ötektik solvent karışımları hazırlanmak suretiyle pek çok denemeler yapıldı. Farklı oranlarda kolin klorür ve laktik asit karışımları ve sıcaklıklar kullanılarak özütlemeler yapıldı. Yapılan çalışmalar referans örneğimiz olan propolisin %70’lik etanolik özütü ile sulu özütüne göre belirlendi. Elde edilen değerler Tablo 11’de verildi. En iyi karışımın 1:10 orandaki kolin klorür ile laktik asit karışımının olduğu ve elde edilen özütün toplam fenolik madde miktarı 42,68 mg GAE/mL olduğu bulundu. Bu değer sulu fazdan (0,90 mg GAE/mL) yüksek olup, etanolik fazdan düşüktür.

Sonuç olarak kolin klorür-laktik asit ile yapılan özütlemelerde en ideal oranın 1:10 ölçülerinde olduğu belirlendi. Ayrıca ideal inkübasyon sıcaklığının 80°C’de 12 saat etüvde olduğu tespit edildi.

Tablo 11. Referans propolis + kolin klorür-laktik asit konsantrasyonlarıyla toplam fenolik madde analizi karşılaştırması

Ekstraktlar	TPC (mg GAE/mL)
Propolis- %70 EtOH	42,68±3,20
Propolis-saf su	0,90±0,10
Propolis- (1:1) kolin klorür + laktik asit	2,30±0,06
Propolis- (1:2) kolin klorür + laktik asit	2,40±0,07
Propolis- (1:5) kolin klorür + laktik asit	2,48±0,06
Propolis- (1:10) kolin klorür + laktik asit	8,88±0,72

Benzer DÖS çalışmasında laktik asit yerine sitrik asit kullanılmak suretiyle kolin klorür ve sitrik asitle karışımından oluşan DÖS uygulandı ve değerler Tablo 12’de özetlendi. Elde edilen değerlerin suda daha yüksek ancak laktik asitle oluşturulan DÖS’ten daha düşük olduğu tespit edildi.

Tablo 12. Propolis+kolin klorür-sitrik asit çözeltisinin toplam fenolik madde miktarı

Ekstraktlar	TPC (mg GAE/mL propolis)
Propolis- %70 EtOH	42,68±3,20
Propolis-saf su	0,90±0,10
Propolis- (1:1) kolin klorür + sitrik asit	2,75±0,05
Propolis- (1:2) kolin klorür + sitrik asit	2,49±0,04
Propolis- (1:5) kolin klorür + sitrik asit	2,43±0,06
Propolis- (1:10) kolin klorür + sitrik asit	2,69±0,05

Çalışmaya kolin klorür ve prolin ile devam edildi. Farklı konsantrasyonlarda yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler Tablo 13'te özetlendi. Elde edilen toplam fenolik madde miktarlarının sudan yüksek ancak kolin klorür ve laktik asit karışımından düşük olduğu bulundu.

Tablo 13. Propolis+kolin klorür-prolin çözeltisi toplam fenolik madde miktarı

Ekstraktlar	TPC (mg GAE/mL propolis)
Propolis- %70 EtOH	42,68±3,20
Propolis-saf su	0,90±0,10
Propolis- (1:1) kolin klorür + prolin	1,88±0,65
Propolis- (1:5) kolin klorür + prolin	1,80±0,15
Propolis- (1:10) kolin klorür + prolin	2,62±0,30

3.2.4. Alkali Çözünürleştirme

Çalışmaya alkali ve sulu ortamdaki propolis özütlemeleri ile devam edildi. Ortamı alkali yapmak için farklı konsantrasyonlardan Na₂CO₃ kullanıldı. Propolis havuzundan saf su ile hazırlanan propolis-Na₂CO₃ ekstraktların alkali ortamdaki çözünürlüğüne farklı konsantrasyonlarda bakılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 14'te özetlendi.

Tablo 14. Propolisin alkali ortamdaki toplam fenolik madde miktarı

Ekstraktlar	TPC (mg GAE/mL propolis)
Propolis- %70 EtOH	42,68±3,20
Propolis-saf su	0,70±0,60
%0,1 Na ₂ CO ₃ + propolis	0,94±0,19
%0,4 Na ₂ CO ₃ + propolis	2,09±0,01
%0,8 Na ₂ CO ₃ + propolis	3,33±0,26
%1 Na ₂ CO ₃ + propolis	5,04±0,08
%1,5 Na ₂ CO ₃ + propolis	6,00±0,60
%2 Na ₂ CO ₃ + propolis	6,05±0,80

Tablo 14’te verilen sonuçlara bakılarak propolisin sodyum karbonat varlığındaki toplam fenolik madde miktarı, konsantrasyon arttıkça doğru orantılı şekilde artış gösterdiği belirlendi. Konsantrasyon %1,5 olduğunda yeterli doygunluğa eriştiği için artan konsantrasyonlarda miktarlar benzer kalmıştır. Alkali ortamdaki bu propolisin tüketilebilmesi gereken pH aralığı olan 3,0-4,5 aralığını elde etmek için harcanan askorbik asit miktarı ölçülmüştür. Çalışmada %20’lik askorbik asit kullanıldı. Tablo 15’te harcanan askorbik asit miktarları veriliyor.

Tablo 15. Na₂CO₃ içeren çözeltilerin yenilebilir pH için gerekli askorbik asit miktarı

Numune	Ölçülen hacim(mL)	pH değeri	Askorbik asit sarfıyatı (µL)	Son pH
Propolis + saf su	2	4,03	-	2,60
%0,1 (Na ₂ CO ₃ + propolis)	3	6,02	55	3,15
%0,4 (Na ₂ CO ₃ + propolis)	2	7,35	80	3,35
%0,8 (Na ₂ CO ₃ + propolis)	2	8,78	80	3,93
%1 (Na ₂ CO ₃ + propolis)	2	8,9	80	4,20
%1,5 (Na ₂ CO ₃ + propolis)	2	9,42	120	4,36

3.2.5. Bitkisel Yağlardaki Propolis Özütləri

Çalışmalarda farklı bitkisel yağlar ile hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Tablo 16’da verildi. Yapılan yağ çalışmasında aralarında en yüksek fenolik madde miktarına sahip olan ekstraktın etanolik propolis özü + 9,75 mL ayçiçek yağı + 0,25 g lesitin karışımına ait olduğu tespit edildi. 6,30 mg GAE/mL ile en yüksek değere sahip bulundu. Propolisin fındık yağı ile özütlemesi ve ayrıca lesitin miktarının fındık yağı ile hazırlanmış propolise etkisine bakılmıştır. Tablo 16’de bu çalışmanın toplam fenolik madde miktarı analiz sonuçları verilmiştir.

Tablo 16. Propolis-yağ karışımlarındaki toplam fenolik madde miktarı

Örnekler	TPC (mg GAE/mL)
Ayçiçek yağı	0,47±0,01
Etanolik propolis özü + 10 mL ayçiçek yağı	0,65±0,02
Etanolik propolis özü + 9 mL ayçiçek yağı+ 1,06 g lesitin	3,07±0,01
Etanolik propolis özü + 10 mL zeytinyağı	1,10±0,02
Etanolik propolis özü + 9 mL zeytinyağı+ 1,07 g lesitin	2,80±0,02
Etanolik propolis özü + 10 mL susam yağı	1,38±0,02
Etanolik propolis özü + 9 mL susam yağı+ 1,12 g lesitin	2,48±0,02
Etanolik propolis özü + 9,75 mL ayçiçek yağı+ 0,25 g lesitin	6,30±0,03
Etanolik propolis özü + 9,50 mL ayçiçek yağı+ 0,58 g lesitin	4,22±0,03

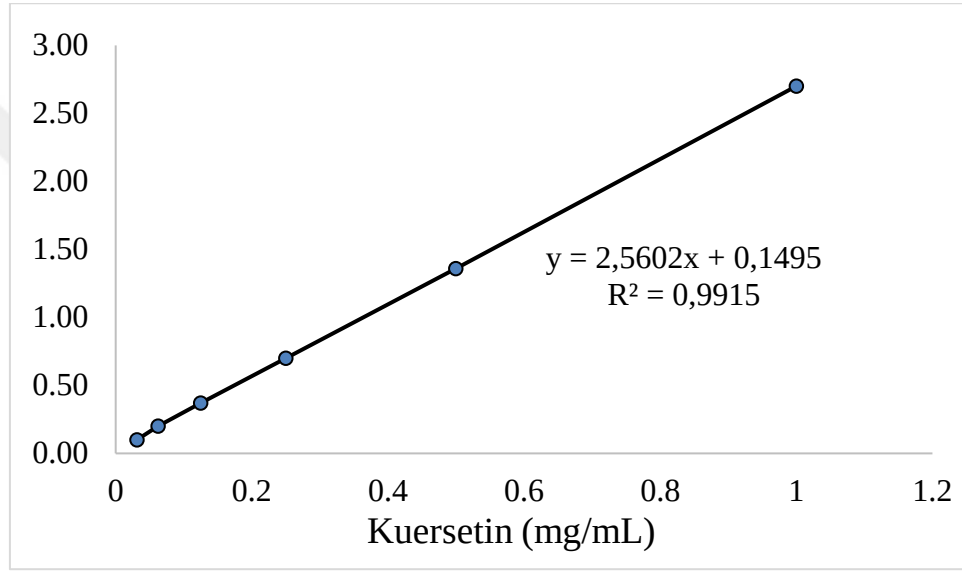
Tablo 17. Propolis ve fındık yağı ile yapılan özütlemelerin toplam fenolik madde miktarı

Örnekler	TP (mg GAE/mL)
Fındık yağı	2,98±0,02
Etanolik propolis özü + 10 mL fındık yağı	12,33±0,04
Etanolik propolis + 0,25 g lesitin + 20 mL fındık yağı	4,68±0,04
Etanolik propolis + 0,50 g lesitin + 20 mL fındık yağı	6,56±0,04
Etanolik propolis + 1,08 g lesitin + 20 mL fındık yağı	11,32±0,05
Etanolik propolis + 1,54 g lesitin + 15 mL fındık yağı	13,04±0,02
Etanolik propolis + 1,94 g lesitin + 15 mL fındık yağı	10,86±0,05
Etanolik propolis + 2,0 g lesitin + 20 mL fındık yağı	7,82±0,05
Etanolik propolis + 3,02 g lesitin + 20 mL fındık yağı	7,27±0,04
Etanolik propolis + 4,03 g lesitin + 20 mL fındık yağı	3,68±0,05

Elde edilen verilere göre en yüksek değerin etanolik propolis özü + 1,54 g lesitin + 15 mL fındık yağı karışımında bulunduğu tespit edildi (Tablo 17). Fındık yağının diğer yağlardan daha uygun bir çözügen olduğu tespit edildi. Sonuçlara bakıldığında, lesitin fındık yağı-propolis ekstraktlarına eklendiğinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlendi.

3.2.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analiz Sonuçları

Propolis ekstraktlarında yapılan toplam flavonoid madde miktar analizleri bölüm 2.10.2’de belirtilen yöntemle yapıldı. Analiz için standart olarak kuersetin kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda yapılan standart ile kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 19) ve hesaplamalar g propolis başına mg kuersetin olarak verildi.



Şekil 19. Kuersetin standart kalibrasyon grafiği

Çalışmalar 15 ay boyunca devam ettiği için her çalışma öncesi standart çalışma grafiği yeniden hazırlandı. Ancak yukarıda (Şekil 19) verilen grafik hazırlanan grafiklerden biri olup, yakın değerlere sahip oldukları da tespit edildi. Tablo 18’de ilk DÖS çalışması olan Kolin klorür ve laktik asit karışımında ait TFC değerler verildi. Toplam fenolik madde miktarları en yüksek bulunan DÖS karışımların ölçüldü.

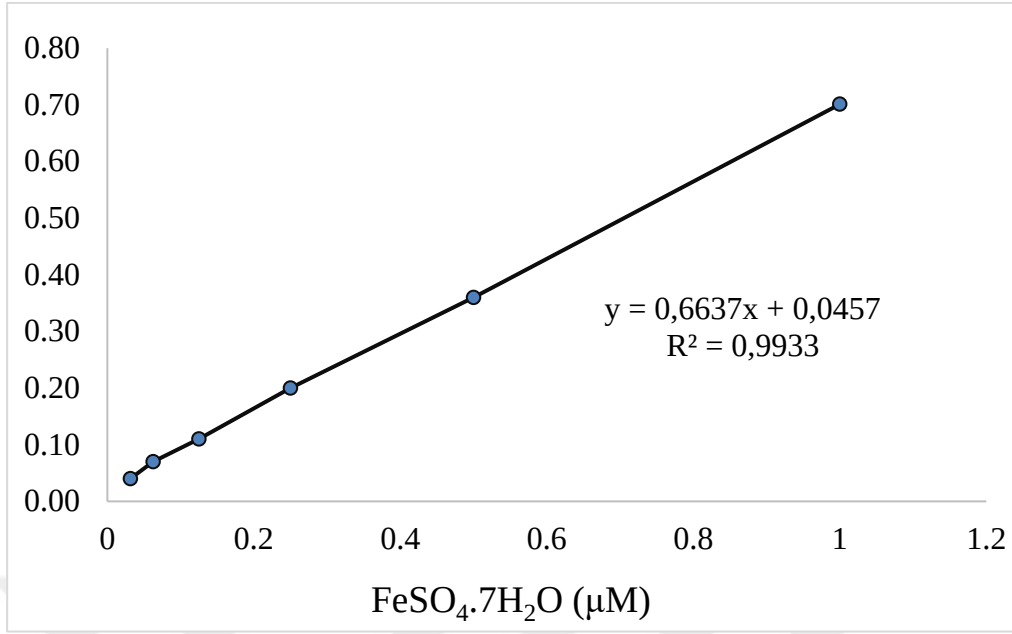
Tablo 18. Özütlerdeki toplam flavonoid madde miktarı

Ekstraktlar	TFC (mg QE/g propolis)
Propolis- %70 EtOH	41,61±0,37
Propolis-saf su	1,30±0,15
Propolis- (1:10) kolin klorür + laktik asit	1,74±0,01
Propolis- (1:10) kolin klorür + sitrik asit	0,14±0,12
Propolis- (1:5) kolin klorür + prolin	0,09±0,04
%1,5 Na ₂ CO ₃ + propolis	2,30±0,10

Yapılan çalışmada toplam flavonoid miktarı en yüksek etanolik propolis 41,61 mg QE/g, %1,5 Na₂CO₃ 'lı propolis 2,28 mg QE/g, 1:10 kolin klorür-laktik asit 1,74 mg QE/g propolis olarak belirlendi. Bitkisel yağlarda toplam fenolik madde miktarları belirlenemedi. Yağlar kolloidler oluşturduğundan dolayı sağlıklı ölçümler alınamadı.

3.2.7. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-FRAP Analiz Sonuçları

Propolis özütlerinde yapılan çalışmada, en yüksek toplam polifenol değerlerine sahip çözeltiler seçilip o numuneler üzerinde FRAP analizleri yapıldı. Çözeltilerde antioksidan varlığında ferrik-tripiridiltriiazin kompleksindeki Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye indirgenmesiyle gerçekleşen renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenen yöntemdir. FeSO₄.7H₂O standart olarak kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplamalar yapıldı ve sonuçlar propolis başına µmol FeSO₄.7H₂O eşdeğeri olarak verildi. Şekil 20'de FeSO₄.7H₂O kalibrasyon standart grafiği verilmiştir.



Şekil 20. FeSO₄.7H₂O kalibrasyon standart grafiği

Tablo 19. Ekstraktlardaki demir (III) indirgeme antioksidan güç-FRAP analiz sonuçları

Ekstraktlar	FRAP (µM FeSO ₄ .7H ₂ O/mL)
Propolis- %70 EtOH	256,16±4,05
Propolis-saf su	86,30±3,20
Propolis- (1:10) kolin klorür + laktik asit	198,76 ± 10,20
Propolis- (1:5) kolin klorür + sitrik asit	123,30±5,60
Propolis- (1:5) kolin klorür + prolin	105,30±6,88
Propolis- (1:5) kolin klorür	95,60±5,82
%1,5 Na ₂ CO ₃ + propolis	180,68 ± 3,00

FRAP analizi için yapılan çalışmada en yüksek sonuçlar, toplam fenolik madde miktarı en yüksek olan çözeltilerde tespit edilmiştir. Bulunan değerlerin TPC ile paralel olduğu tespit edildi (Tablo 19).

3.2.8. DPPH• Radikal Temizleme Aktivite Analiz Sonuçları

DPPH• radikal temizleme aktivitesi, çözücüdeki antioksidan bileşenlerin oksidan bileşikler ile bir tepkimeye girerek oksidan maddelerini yok etmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde çizilen standart kalibrasyon grafiği üstel bir grafik olup, radikalın yarısını temizlemek için gerekli olan özüt miktarı (SC_{50}) hesaplanmasıyla belirlenmektedir. Yapılan çalışmada standart olarak troloks kullanıldı. Grafikten standart maddenin SC_{50} değeri hesaplandı. Numunelerin absorbansı troloks standardının SC_{50} değerine göre karşılaştırılarak hesaplamalar mg/mL olarak verildi. Troloks standardından yapılan SC_{50} değerlerinden, ölçülen örneklerin de hesapları yapılarak SC_{50} değeri Tablo 20’de verilmiştir. SC_{50} değeri ne kadar düşük ise antioksidan temizleme aktivitesi o kadar yüksek olduğundan tablodaki verilen sonuçlar, aralarında en yüksek temizleme oranına sahip çözeltiler olduğu belirlendi.

Tablo 20. Ekstraktlardaki DPPH• aktivite değerleri

Ekstraktlar	SC_{50} mg/mL propolis
Propolis- %70 EtOH	$0,02 \pm 0,00$
Propolis-saf su	$0,05 \pm 0,01$
%1,5 Na_2CO_3 + propolis	$0,03 \pm 0,01$
Propolis- (1:10) kolin klorür + laktik asit	$0,05 \pm 0,10$

3.3. RP-HPLC-PDA ile Yapılan Fenolik Bileşen Analizleri

Bitkilerde ve arı ürünlerinde fenolik içerik analizi için geliştirilen yöntemin validasyonu için 1,188-38,000 ppm aralığında standartlar test edildi (Kara ve Birinci, 2024). Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığı, yöntemin geri kazanımı, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 21).

Tablo 21. Standartlar için RP-HPLC-PDA sistemindeki kalibrasyon bilgileri

Standart Madde	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Geri kazanım (%)
Gallik asit	0,999	0,043	0,142	99,296
Protokatekuik asit	0,999	0,062	0,205	100,838
Klorojenik asit	0,999	0,034	0,115	101,757
Kateşin hidrat	0,999	0,019	0,063	98,917
<i>p</i> -OH Benzoik asit	0,999	0,044	0,148	102,816
Epikateşin	0,997	0,033	0,109	102,843
Kafeik asit	0,999	0,072	0,239	102,716
Vanilik asit	0,998	0,043	0,143	97,803
Şiringik asit	0,999	0,021	0,071	98,725
<i>p</i> -Kumarik asit	0,999	0,064	0,214	102,830
Rutin	0,999	0,047	0,156	100,417
Ellajik asit	0,999	0,062	0,208	99,554
Ferulik asit	0,995	0,026	0,088	103,073
Mirisetin	0,998	0,032	0,108	101,348
Daidzein	0,999	0,050	0,166	100,719
Luteolin	0,994	0,032	0,106	103,351
Kuersetin	0,999	0,029	0,098	99,101
<i>t</i> -sinnamik asit	0,999	0,021	0,071	99,242
Naringenin	0,996	0,026	0,087	99,181
Apigenin	0,999	0,037	0,123	103,948
Hesperetin	0,999	0,023	0,075	101,289
Ramnetin	0,996	0,028	0,094	101,445
Krisin	0,999	0,027	0,091	99,146
Pinosembrin	0,999	0,037	0,123	99,303
CAPE	0,999	0,025	0,083	103,456
Galangin	0,999	0,023	0,077	103,647

Yapılan çalışmalarda etanolik propolis, sulu propolis, 1:10 kolin klorür-laktik asit propolis, %1,5 Na₂CO₃'lı propolis ve fındık yağı + lesitin + propolis ekstraktları RP-HPLC-PDA'da yürütüldü. Tablo 22'de fenolik analizi verilmiştir.

Tablo 22. RP-HPLC-PDA fenolik analiz sonuçları

Standart Madde (µg/g)	Etanolik Propolis	Sulu propolis	%1,5 Na ₂ CO ₃ 'lı propolis
Gallik Asit	-	2,99	-
Protokatekuik Asit	-	13,90	-
Klorojenik Asit	-	-	-
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	84,72	8,83	8,813
Epikateşin	-	-	-
Kateşin hidrat	-	18,46	-
Kafeik Asit	1820,76	3627,55	-
Şiringik Asit	-	-	-
<i>m</i> -OH Benzoik Asit	-	-	-
Rutin	-	-	-
Ellajik Asit	-	-	-
<i>p</i> -Kumarik Asit	1661,20	609,78	77,40
Ferulik Asit	2132,13	89,63	35,11
Mirisetin	-	-	-
Resveratrol	-	-	-
Daidzein	-	-	-
Luteolin	21,10	-	-
Kuersetin	460,44	-	-
<i>t</i> -sinnamik Asit	342,61	22,20	23,14
Apigenin	751,25	-	7,34
Hesperetin	450,95	309,76	8,52
Ramnetin	-	8,91	-
Krisin	7962,00	37,33	80,79
Pinosembrin	8114,60	138,26	38,29
CAPE	2327,96	33,31	14,17
Galangin	-	47,63	-

*- : Tespit edilemedi

Fenolik profilinde sonuçlara göre sulu propolis ile %1,5 Na₂CO₃'lı propolis ekstraktlarında *p*-OH benzoik asit miktarları birbirine oldukça yakın bulundu. Apigenin sodyum karbonatlı çözeltide bulunmakla beraber, sulu ekstraktında tespit edilemedi. Krisin miktarı %1,5 Na₂CO₃'lı propolis ekstraktında sulu çözeltiye göre iki kat daha fazla bulundu.

Tablo 23. Fındık yağı+lesitin+propolis ekstraktının fenolik analizi

Standart Madde (µg/mL)	Fındık yağı + Lesitin + Propolis
Gallik Asit	-
Vanilik Asit	60,74
Protokatekuik Asit	-
Klorojenik Asit	-
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	-
Epikateşin	-
Kafeik Asit	28,64
Şiringik Asit	-
Rutin	-
Ellajik Asit	-
<i>p</i> -Kumarik Asit	170,15
Ferulik Asit	2042,50
Mirisetin	6084,44
Galangin	-
Daidzein	-
Luteolin	-
Kuersetin	-
<i>t</i> -sinnamik Asit	469,09
Apigenin	-
Hesperetin	-
Ramnetin	-
Krisin	379,57
Pinosembrin	2331,16
CAPE	1496,69
Naringenin	-

*- : Tespit edilemedi

Fındık yağı ve lesitin ile hazırlanan propolis örneğindeki fenolik profil analiz sonuçlarına bakıldığında, ferulik asit miktarı etanolik propolis ile hazırlanan çözeltideki yapılan analiz sonucundaki karşılaştırılması yapıldığında sonuçların oldukça yakın olduğu tespit edildi (Tablo 23). Fındık yağının diğer yağlardan daha uygun bir çözügen olduğu tespit edildi. Fındık yağı özütünde RP-HPLC-PDA ile yapılan fenolik analizinde en yüksek 6084 µg/mL mirisetin varlığı tespit edilirken, pinocembrin 2331 µg/mL, ferulik asit 2042 µg/mL, CAPE 1496 µg/mL ve krisin 379 µg/mL olarak hesaplandı.

Tablo 24. Propolis + 1:10 kolin klorür + laktik asit örneğinin HPLC fenolik profili

Standart Madde (µg/g)	Propolis+1:10 Kolin klorür + Laktik asit
Gallik Asit	-
Vanilik Asit	-
Protokatekuik Asit	-
Klorojenik Asit	-
<i>p</i> -OH Benzoik Asit	-
Epikateşin	-
Kafeik Asit	30425,42
Şiringik Asit	-
Rutin	-
Ellajik Asit	-
<i>p</i> -Kumarik Asit	1931,80
Ferulik Asit	6035,76
Mirisetin	-
Galangin	25915,97
Daidzein	-
Luteolin	-
Kuersetin	2417,87
<i>t</i> -sinnamik Asit	165,87
Apigenin	3086,80
Hesperetin	13599,48
Ramnetin	5902,20
Krisin	24797,12
Pinosembrin	35183,63
CAPE	11466,35
Naringenin	-

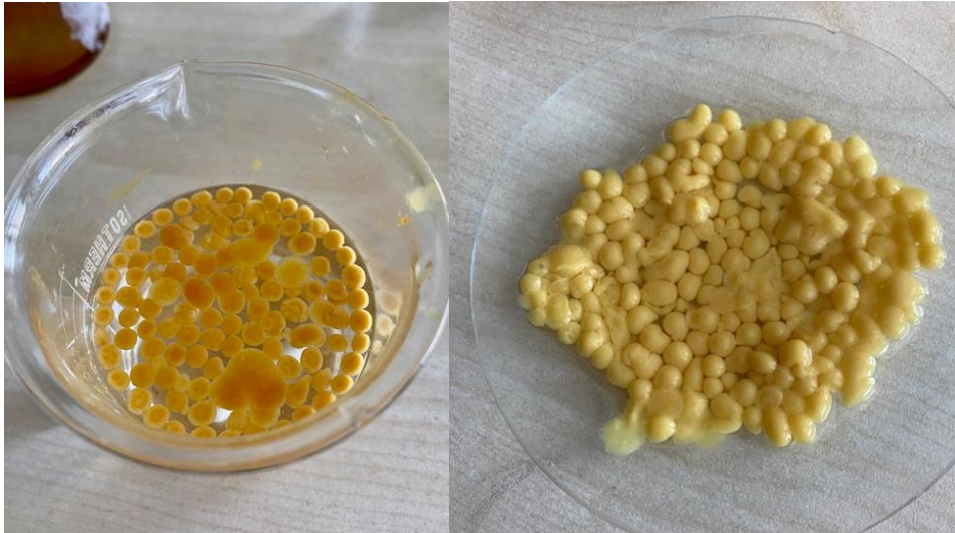
*- : Tespit edilemedi

Propolis-1:10 kolin klorür+laktik asit çözeltisindeki fenolik profiline bakıldığında, etanolik çözeltiye göre oldukça yüksek değerlere sahip standartlar arasındaki farklar gözlenmektedir. Tablo 22 ve 24 karşılaştırıldığında kafeik asit miktarı 1:10 kolin klorür + laktik asit çözeltisinde, etanolik propolise göre 16 kat daha fazla, ferulik asit miktarı 3 kat, kuersetin 5 kat, apigenin 4 kat, hesperetin 30 kat, krisin 3 kat, pinosembrin 4 kat, CAPE ise 5 kat daha fazla miktarı olduğu tespit edildi.

3.4. Enkapsülasyon Çalışmaları

3.4.1. İyonik Jelasyon Yöntemi ile Kapsülasyon Oluşumu

İyonik jelasyon metodu pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Enkapsülant ile aktif madde homojen bir şekilde karıştırılır ve bir şırınga vasıtasıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl_2 gibi) damlatılır (McClements ve Li, 2010). Burada kullanılan yöntem daha çok kalsiyum alginat kapsüllerinin elde edilmesinde kullanılan yöntemi taklit ederek uygulandı. Pektin negatif yüklü doğal bir polimer olduğu için Ca^{+2} iyonları ile çapraz bağlar oluşturmak suretiyle propolis özütleri ile enkapsülasyon oluşturmaktadır (yumurta kutusu modeli). Kapsülasyon için CaCl_2 çözeltisi 0,05 M 1 L olacak şekilde hazırlandı. %1'lik, %2'lik, %3'lük ve %4'lük olacak şekilde 4 farklı konsantrasyonlarda pektin çözeltisi hazırlandı. Pektin çözeltisi saf su ile karıştırıldı ve çözülene kadar 80 °C 200 rpm'de bekletildi. Yapılan denemelerde en iyi sonucun %3'lük pektin çözeltisinde sonuç alındığı gözlemlendi. 2 mL propolis özütü ve 2 mL %3'lük pektin çözeltisi homojen olacak şekilde karıştırıldı. Bir behere konulan 100 mL CaCl_2 çözeltisi manyetik karıştırıcı ile birlikte 200 rpm'de karıştırılırken, enjeksiyon yardımı ile propolis-pektin karışımı damla damla ilave edildi. 15 dk karıştıktan sonra süzüldü, saat camına konuldu (Şekil 21) ve 60°C'de 5 saat kurutuldu.



Şekil 21. Propolis-Pektin kapsülleri

Kurutma işleminden sonra kapsüller saat camından kazıldı (Şekil 22). Süzüntüsü ile Toplam polifenol (TPC) tayini yapılarak bağlanan polifenol miktarları belirlendi. 2 ayrı propolis özütü ile üzerinde çalışmalar yürütüldü. İlk ekstrakt için %10'luk propolis-etil alkol karışımı hazırlandı. 12,035 g propolise 120 mL etil alkol eklendikten sonra 2 saat ultrasonik banyoda 24 saat çalkalayıcı bekletildikten sonra süzüldü. İkinci ekstrakt %30'luk propolis-etil alkol olacak şekilde hazırlandı. 9 g propolise 120 mL etil alkol eklendikten sonra aynı işlemler uygulandı. Öncelikle kapsülleme yapıldıktan sonra elde edilen süzüntüdeki propolis miktarı TPC cinsinden tespit edildi.



Şekil 22. Kurutulmuş pektin-propolis kapsülleri ve toz hali

3.4.2. Pektin-Propolis Kapsüllerinin Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Enkapsülasyon Etkinliği

Kapsüllerin elde edilmesinde kullanılacak pektin miktarı ve propolis miktarı belirlendikten sonra elde edilecek kapsüllerin kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla toplam fenolik madde tayini bölüm 2.10.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Tablo 25'te toplam polifenol sonuçları verildi. Enkapsülasyon etkinliği hesaplandı. Tablo 26'da enkapsülasyon etkinlik sonuçları verilmiştir.

Tablo 25. Propolis-pektin kapsüllerinin toplam fenolik madde analiz sonuçları

Numune adı	TPC (mg GAE/mL)
%10'luk propolis-etanol	14, 26±0,02
%10'luk propolisin kapsülasyondaki süzüntüsü	0,50 ±0,01
%30'luk propolis-etanol	46,37±0,05
%30'luk propolisin kapsülasyondaki süzüntüsü	2,34±0,50

Pektin ile yapılan iyonik jelasyon tekniğine göre iki farklı konsantrasyonda hazırlanan etanolik propolis özütü ile enkapsülasyon çalışması yapıldı ve propolis özütünün miktarı ne kadar yüksek ise bağlanmanın o kadar yüksek olduğu tespit edildi. Her iki durumda da bağlanma oranlarının %90 üzerinde olduğu gözlemlendi.

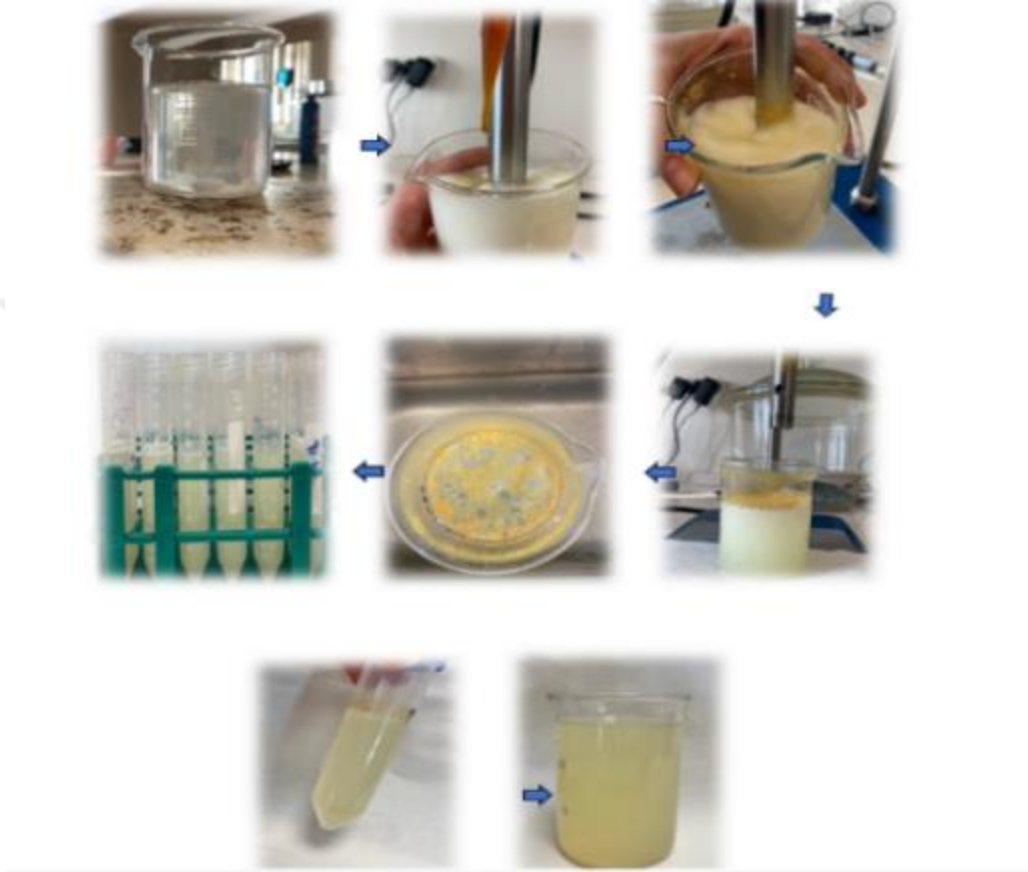
Tablo 26. İyonik jelasyon ile elde edilen kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği

Numune adı		% Bağlanma
%10'luk propolis-etanol	(14,26-0,50) / 14,26 x100	%96
%30'luk propolis-etanol	(46,37-2,34) / 46,37x100	%96

3.4.3. Dondurarak Kurutma ve Püskürterek Kurutma ile Enkapsülasyon Çalışmaları

İki teknik için gerekli cihazlar olmadığından Akdeniz Üniversitesi, Gıda Mühendisliği bölümünden yardım alındı. PK ve DK tekniklerinde pektin ve inülin enkapsüle ürünlerinin daha kararlılık olması için %30 oranda maltodekstrin ilave edilerek çalışmalar yürütüldü. Propolis örneklerinin enkapsülasyonu için Šturm ve arkadaşlarının 2019'da uyguladığı yöntem modifiye edildi. Bu doğrultuda 2:2 maltodekstrin:inülin ve 2:2 maltodekstrin:pektin üzerine 100 mL su ilave edilip oda sıcaklığında 600 rpm'de karıştırıcıda gece boyunca hidratlanması için bırakıldı. Elde edilen pektin çözeltileri için kuru madde içeriğinin %35'i, inülin çözeltileri için kuru madde içeriğinin %20'si olacak şekilde damla damla propolis ilave edilerek karışımlar homojenizatör yardımı ile 12000 rpm'de 10 dk süre ile homojenize edildi. Ardından propolis taşıyıcı çözeltiler, 20 dk boyunca ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulduktan sonra ultrasonikatörde 5 dk boyunca 12000 rpm'de homojen hale getirildi.

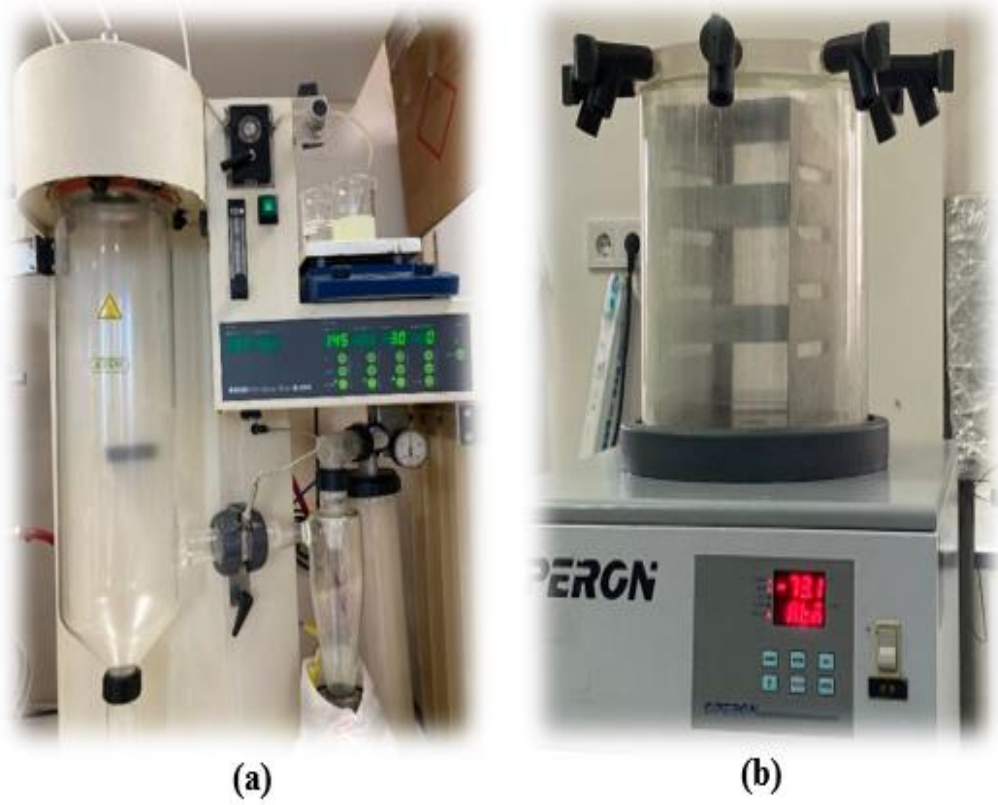
Homojenize edilen çözeltiler 500 rcf'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş olup, elde edilen süpernatantlar dikkatlice alınarak dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma için hazır hale getirildi (Şekil 23).



Şekil 23. Propolis enkapsülasyonunun şematik gösterimi

3.4.4. Püskürterek ve Dondurarak Kurutma İşlem Koşullarının Belirlenmesi

Püskürterek kurutma yoluyla enkapsülasyon elde etmek için, mini sprey kurutucuda püskürterek gerçekleştirildi. Kurutma işlemlerinde besleme hızı, çıkış sıcaklığı ve aspirasyon hızı sabit tutularak, besleme sıcaklığı 145°C, çıkış sıcaklığı 75±2°C ve aspirasyon hızı %70 olarak çalışmalar yapıldı. Ayrıca hazırlanan çözeltiler 6 saat, -80 °C'deki dondurucuda bekletilmiş daha sonra dondurarak kurutucuda -70 °C'deki serpantin sıcaklığı ve 40 mm-Hg mutlak basınçta kurutuldu (Şekil 24).



Şekil 24. Propolis enkapsülasyon yöntemleri **a.** Püskürterek kurutucu, **b.** Dondurarak Kurutucu

3.4.5. Püskürterek ve Dondurarak Kurutma ile Elde Edilen Kapsüllerin Enkapsülasyon Etkinlikleri

Enkapsülasyon etkinliği, püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen tozlarda yapılan toplam fenolik madde miktarı analizi ile hesaplanmış olup, kapsülleme verimliliği aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı (Toprakçı vd., 2023). Tablo 27’de püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kapsüllerin toplam fenolik, yüzde fenolik madde miktarları ve enkapsülasyon etkinliği verilmiştir.

$$EE (\%) = [(TFM - YFM) / TFM] \times 100 \quad (3)$$

Burada;

TFM= Toplam fenolik madde miktarı (mg/100 g KM)

YFM= Yüzey fenolik madde miktarı (mg/100 g KM)

Tablo 27. Püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği

Numune adı	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg/100 g)	Yüzey Fenolik Madde Miktarı (mg/100 g)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
PK Pektin	7,88±0,12	4,24±0,16	46,56±3,32
PK İnülin	3,12±0,12	1,53±0,64	50,41±3,65
DK Pektin	13,33±0,39	7,43±0,53	44,26±2,42
DK İnülin	3,86±0,99	2,40±0,12	37,64±1,62

PK:Püskürterek Kurutma

DK:Dondurarak Kurutma

Şekil 25’de elde edilen kapsüllerin görüntüleri verilmiştir. Yapılan bu çalışmada toplam fenolik madde miktarı en yüksek olan örnek pektin ile hazırlanan kapsüllerde gözlemlendi. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma tekniklerine göre iyonik jelasyon da olduğu gibi pektin polimerinin daha uygun olduğu ve kapsülasyon verimlerinin ise yaklaşık %50 olduğu tespit edildi. İnülin ancak maltodekstrin ile birlikte propolis kapsülleyebildiği tespit edildi.



Şekil 25. Enkapsüle toz örneklerinin görüntüsü (a. Püskürterek kurutma- Pektin, b. Püskürterek kurutma – İnülin c. Dondurarak kurutma- Pektin d. Dondurarak kurutma- İnülin)

3.4.6. Enkapsüle Ürünlerin Karakteristik Özellikleri

Hazırlanan 5 farklı enkapsüle propolis ürünü içinde % nem değerinin %8 ile 12 arasında değişim gösterdiği belirlendi. En düşük nem içeriğine sahip ürünün (%7,98) püskürterek kurutma tekniği ile elde edilen ve en yüksek dondurarak kurutma tekniği olduğu tespit edildi. En yüksek su aktivitesinin iyonik jelasyon ile üretilen kapsüllerde ve en düşük dondurarak kurutma tekniği ile elde edilen ürünlerde tespit edildi.

Su aktivitesi 0 ile 1 arasında bir değer alırken, düşük su aktivitesine sahip ürünün daha stabil olduğu söylenmektedir. Su aktivitesi, bir malzemenin içindeki suyun kimyasal ve biyolojik aktiviteye olan potansiyel etkisini belirtir. Çünkü su molekülleri kimyasal reaksiyonlara ve mikroorganizmaların gelişimine daha az katkıda bulunabilir.

Bu nedenle, enkapsüle edilmiş ürünlerin su aktivitesi düşük tutulmaya çalışılır, böylece ürünün raf ömrü uzatılabilir ve istenmeyen reaksiyonlar minimize edilebilir. Enkapsüle ürünlerdeki su aktivitesi, kapsül içindeki suyun serbest su moleküllerinin mevcudiyetini ve bu suyun kimyasal reaksiyonlara ve mikroorganizmaların gelişimine olan etkisini gösteren bir ölçümdür. Bu değer ürünün stabilitesi, raf ömrü ve kalitesi üzerinde önemli bir rol oynar (Soottitantawat vd., 2004). En yüksek su aktivitesine sahip ürün İJ-pektin olmasına rağmen, tüm ürünlerdeki su aktivitesinin 0,30'dan küçük olması, tüm ürünlerdeki su aktivitesinin düşük olduğunu ifade eder. Yani, düşük su aktivitesine sahip ürünlerde mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilir ve ürünün raf ömrünü uzatabilir. Tablo 28'de karakteristik özelliklerinden nem, su aktivitesi değeri, kurutma ve çözünürlük miktarları verilmiştir.

Tablo 28. Enkapsüle toz örneklerin nem miktarı, a_w değerleri, kurutma verimi ve çözünürlük analiz sonuçları

Örnek Adı	Nem Miktarı (%)	a_w	Kurutma Verimi (%)	Çözünürlük (%)
İJ Pektin	10,20±0,50	0,2624±0,02	68,30	96,30±0,95
PK Pektin	7,98±0,41	0,2551±0,02	69,94	93,51±0,25
PK İnülin	9,34±0,50	0,2554±0,01	77,99	95,27±4,04
DK Pektin	11,53±0,32	0,1393±0,01	92,56	89,95±0,58
DK İnülin	11,42±1,86	0,1593±0,00	86,99	95,44±0,78

Enkapsüle örneklerin çözünürlük değerlerinin %89 ile %96 arasında değişim gösterdiği, en yüksek çözünürlük değerine sahip ürünün iyonik jelasyon pektinli üründe olduğu belirlenirken, tüm ürünlerin yüksek çözünürlük değerine sahip olduğu tespit edildi.

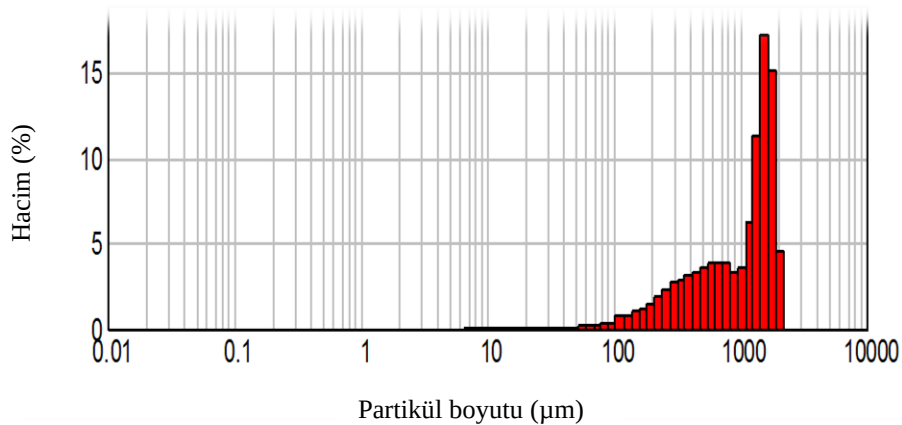
Enkapsüle propolis kapsüllerinin depolama ve paketleme açısından önemli bir kriteri de yığın yoğunluğu ve sıkıştırılmış yoğunluk ile akabilirlik (Carr İndeks) değerleridir. Enkapsüle ürünlerdeki sıkıştırılmış yoğunluk, genellikle kaplama veya kapsülleme işlemi sonrasında ürünlerin yoğunluğunu ifade etmektedir. Bu değer, ürünlerin içerisindeki kaplama maddelerinin veya kapsül materyallerinin ne kadar sıkıştırıldığını ve dolayısıyla ne kadar yoğun olduklarını gösterir. Sıkıştırılmış yoğunluk, genellikle kg/m^3 biriminde ifade edilir ve ürünün fiziksel özelliklerini, performansını ve stabilitesini etkileyebilmektedir.

3.4.7. Enkapsüle Örneklerinin Partikül Analizi

Enkapsüle toz örneklerinin partikül boyut dağılımı D[4,3] (μm), span (açıklık), d90, d10 ve d50 değerleri lazer ışığı kırınım prensibi ile çalışan partikül boyutu ölçüm cihazı ile analiz edildi. Sonuçlar Tablo 29’da verilmiştir. d90, d10 ve d50 sırasıyla %90, %10 ve %50 kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çapları ifade etmekte olup püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen enkapsüle tozların daha küçük partikül boyutuna sahip olduğu belirlendi. Şekil 26, 27, 28, 29 ve 30’da enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafikleri verilmiştir.

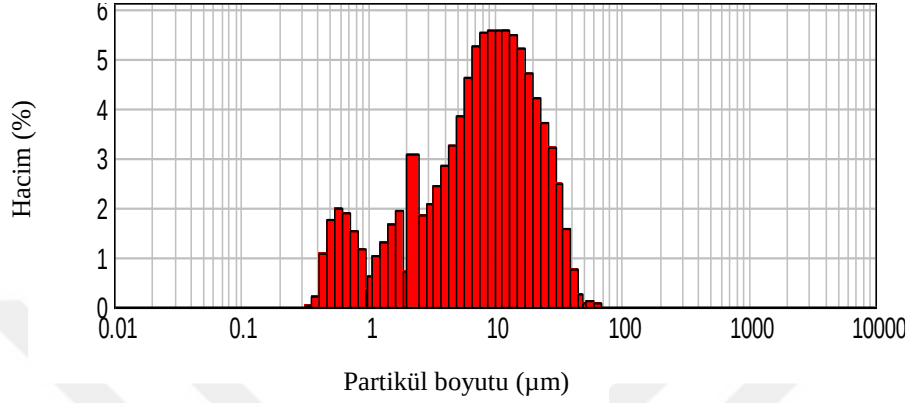
Tablo 29. Enkapsüle toz örneklerin partikül analiz sonuçları

Örnekler	Span	D [4, 3]	D [3, 2]	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)
Pektin-İJ	1,18±0,11	1152,36±71,0	585,28±67,8	291,99±39,4	1304,06±94	1821,26±13
İnülin-PK	2.504±0.01	8.599±0.07	2.984±0.01	1.000±0.00	6.966±0.04	18.441±0.19
Pektin- PK	2.774±0.09	10.586±0.62	3.067±0.10	0.963±0.08	8.111±0.30	23.477±1.67
İnülin-DK	1.767±0.23	205.84±14.97	120.12±3.39	65.87±7.69	177.93±12.7	381.62±55.0
Pektin-DK	2.358±0.09	263.42±12.11	135.39±2.38	69.42±1.44	200.68±7.19	522.19±29.3



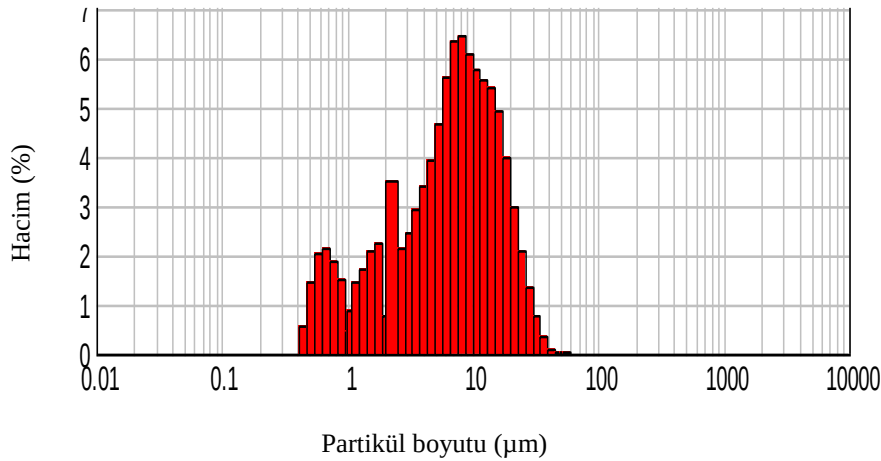
Şekil 26. Pektin-iyonik jelasyon ile elde edilen enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği

Pektin- iyonik jelasyon ile elde edilen enkapsüle propolis tozunun partikül boyu dağılımı Şekil 26’da gösterilmiştir. Partikül dağılımı incelendiğinde 100 μm ile 2000 μm boyutunda partikülleri yapısında bulunduğu, 1000 μm ve üzerindeki partiküllerin hacimsel olarak daha fazla bulunduğu tespit edildi.



Şekil 27. Pektin-püskürterek kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği

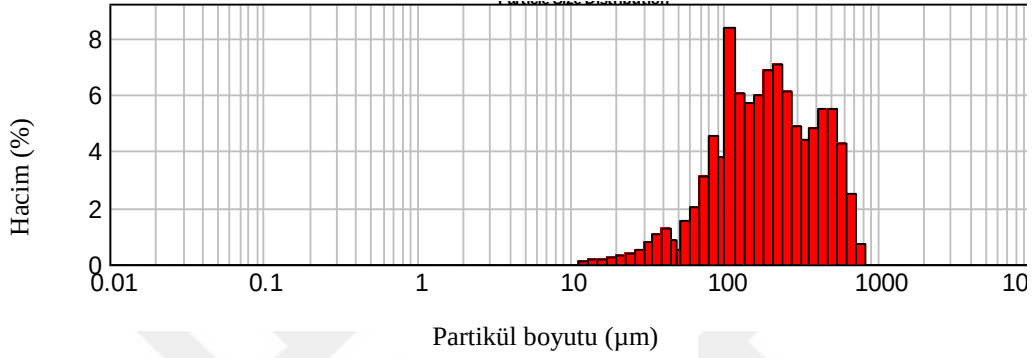
Pektin kaplama materyali kullanılarak püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsüle edilen tozları, partikül boyutları açısından değerlendirildiğinde yaklaşık %10’unun 1 μm den düşük olduğu görülmektedir. Tozların %50’sinin 8-12 μm arasında toplandığı ve tüm partiküllerin 100 μm ’den düşük boyutlara sahip olduğu tespit edildi (Şekil 27).



Şekil 28. İnülin- püskürterek kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği

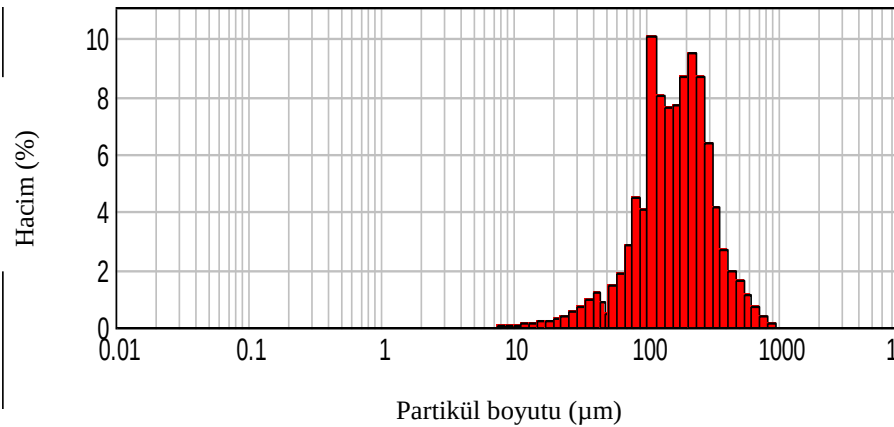
Şekil 28 incelendiğinde inülin kaplama materyali kullanılarak püskürterek kurutma yöntemiyle üretilen enkapsüle tozların bileşiminde geniş aralıkta farklı boyutlara sahip

tozların bulunduğu tespit edildi. Hacimsel olarak tek başına 5-9 μm aralığında partiküllerin en yüksek miktara ulaştığı ve toplam hacmin %50'sini bu partikül boyutlarının oluşturulduğu görülmektedir. Püskürterek kurutma yöntemi ile üretilen tozlarda kaplama materyalinin partikül boyutu üzerine etkisi incelendiğine, inülin kullanımının partikül boyutunda ortalama hacimsel alan boyutu ($D[4,3]$) açısından daha küçük tozların üretimine olanak sağladığı sonucuna ulaşıldı.



Şekil 29. Pektin-dondurarak kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği

Pektin kaplama materyali kullanılarak dondurarak kurutucuda enkapsüle edilen propolis tozlarının partikül boyutu 10-1000 μm aralığında değiştiği belirlendi (Şekil 29). Tozların 100-600 μm boyutundaki partikül boyutlarının hacimsel olarak birbirine yakın olduğu görüldü.



Şekil 30. İnülin-dondurarak kurutulmuş enkapsüle tozun partikül boyutu dağılım grafiği

Dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiş inülin kaplı propolis tozlarının partikül boyutu dağılımı pektin kaplı örneklerle benzerlik göstermiş olup, değerlerin 10-1000 µm aralığında olduğu tespit edildi (Şekil 30). Hacimsel olarak 100-500 µm partikül boyutuna sahip örnekler tozların yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Aynı üretim prosesi ile üretilen pektin kaplı propolis tozlarına kıyasla inülin kaplı enkapsüle tozların daha küçük ve daha homojen yapıda olduğu belirlendi.

3.5. Kapsüllerde *in vitro* Gastrointestinal Sistem

Yapılan çalışma bölüm 2.12.5'te anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplama aşağıdaki formülde verilmiştir. Tablo 30'da yukarıdaki sindirim modeline göre yapılan biyoyararlılık test değeri verildi.

$$\text{Biyoyararlılık (\%)} = [\text{BC (sindirim sonrası)} / \text{BC(başlangıç)}] \times 100 \quad (4)$$

BC (sindirim sonrası): *In vitro* sindirim sonucunda elde edilen süpernatantta tespit edilen miktar/aktivite; BC (başlangıç): Sindirim öncesinde tespit edilen miktar/aktivite

Tablo 30. Kapsüllerin Biyoyararlılık değerleri (sindirim testleri)

	%70'lik EtOH ekstrakta geçen	Sindirim Öncesi Sulu (mg GAE/g)	Sindirim Sonrası Sulu (mg GAE/g)	%Biyoyararlılık (sonrası/öncesi)*100
PK -Pektin	9,82±0,24	3,31±0,03	2,39±0,25	72,02±1,30
DK-Pektin	17,49±0,80	3,38±0,06	2,74±0,04	81,30±2,05
PK-İnülin	3,18±0,11	2,73±0,10	1,52±0,02	55,00±3,55
DK-İnülin	3,41±0,00	2,51±0,04	2,04±0,16	40,40±3,02
İJ-Pektin	38,30±0,21	17,07±0,81	15,64±0,27	91,39±6,52

Kapsüllerin biyoyararlılık değerleri %40 ile %90 arasında değişim gösterdiği tespit edilirken en yüksek değer en yüksek iyonik jelasyon ile elde edilen kapsüle ait olduğu belirlendi. Daha sonra pektinle yapılan dondurarak kurutma tekniği ile elde edilen kapsüllerin %81’lik biyoyararlılık değerine sahip olduğu tespit edilirken, inülin ile yapılan denemede en düşük değere sahip olduğu belirlendi.

3.5.1. Kapsüllerin RP-HPLC-PDA Fenolik Analizi

Tablo 31’de kapsüllerin RP-HPLC-PDA ile yapılan fenolik kompozisyonu verildi. Tüm kapsüller %70’lik etanol ile hazırlandı ve HPLC’de yürütüldü. 26 adet fenolik standarda göre yapılan özütlemeye sonucunda hidroksibenzoik asit sınıfına ait toplam 7 fenolik bileşenin tayin limitleri altında kaldığı saptandı. Tüm kapsüllerin hidroksisinnamik asit türevlerince zengin olduğu belirlendi. Bu sınıftan kumarik asit en yüksek bulunurken, püskürtmeli kurutmada en yüksek bulundu. Flavonol grubundan galangince zengin, Flavonlar grubundan ise pinosembren ve hesperetince zengin bulundu.

Tablo 31. Kapsüllerin RP-HPLC-PDA ile ölçülen fenolik bileşimleri

	Fenolik standart (µg/g)	DK-İnülin	DK-Pektin	PK-İnülin	PK-Pektin
Fenolik asitler	<u>Hidroksibenzoik asitler</u>				
	<i>p</i> -OH Benzoik asit	-	-	-	-
	Vanillik asit	-	-	-	-
	Protokatekuik asit	-	-	-	-
	Gallik asit	-	-	-	-
	Klorojenik asit	-	-	-	-
	Siringik asit	-	-	-	-
	Ellajik asit	-	-	-	-
	<u>Hidroksi-sinnamik asitler</u>				
	<i>t</i> -Sinnamik asit	30,69	82,83	34,14	49,35
	Ferulik asit	634,83	1566,69	613,69	994,04
	<i>p</i> -Kumarik asit	389,91	808,05	369,82	608,85
	Kafeik asit	114,88	285,97	115,63	192,34
	Kafeik asit fenil ester (CAPE)	78,00	492,36	124,84	305,40

Tablo 31' in devamı

Flavonoid	<u>Flavonol</u>				
	Ramnetin	-	-	-	-
	Kuersetin	-	-	-	-
	Rutin	-	-	-	-
	Mirisetin	-	-	-	-
	Galangin	91,28	820,67	298,79	386,53
	<u>Flavan-3-ol</u>				
	Epikateşin	-	-	-	-
	Kateşin hidrat	-	-	-	-
	<u>Flavonlar</u>	-	-	-	-
	Krisin	97,41	750,83	214,59	402,66
	Daidzein	-	-	-	-
	Apigenin	-	-	-	-
	Luteolin	-	-	-	-
	<u>Flavanonlar</u>	-	-	-	-
	Pinosembrin	189,69	1010,07	378,65	478,90
	Hesperetin	134,18	531,24	321,45	323,47
(-) tespit edilemedi					

Tablo 32. İyonik Jelasyonla elde edilen pektinli kapsüllerin RP-HPLC-PDA analizleri

	Fenolik Standartlar (µg/g)	İyonik jelasyon %70 EtOH	İyonik jelasyon sulu
Fenolik asitler	<u>Hidroksibenzoik asitler</u>		
	<i>p</i> -OH Benzoik asit	65,53	97,07
	Vanilik asit	-	-
	Protokatekuik asit	-	-
	Gallik asit	-	-
	Klorojenik asit	-	-
	Siringik asit	-	-
	Ellajik asit	-	-

Tablo 32' nin devamı

Flavonoid	<u>Hidroksi-sinnamik asitler</u>	-	-
	<i>t</i> -Sinnamik asit	-	-
	Ferulik asit	2074,85	975,84
	<i>p</i> -Kumarik asit	1555,08	853,82
	Kafeik asit	1393,54	1006,41
	Kafeik asit fenil ester (CAPE)	3831,38	511,69
	<u>Flavonol</u>	-	-
	Ramnetin	-	-
	Kuersetin	671,37	94,22
	Rutin	-	-
	Mirisetin	-	-
	Galangin	1503,71	2281,36
	<u>Flavan-3-ol</u>	-	-
	Epikateşin	-	-
	Kateşin hidrat	-	-
	<u>Flavonlar</u>	-	-
	Krisin	11400,14	1572,59
	Daidzein	-	-
	Apigenin	-	-
	Luteolin	-	-
	<u>Flavanonlar</u>	-	-
	Pinosembrin	14782,42	2054,87
	Hesperetin	6398,68	1913,93
(-) tespit edilemedi			

Tablo 33. Kapsüllerin sindirim sonrası fenolik analizleri

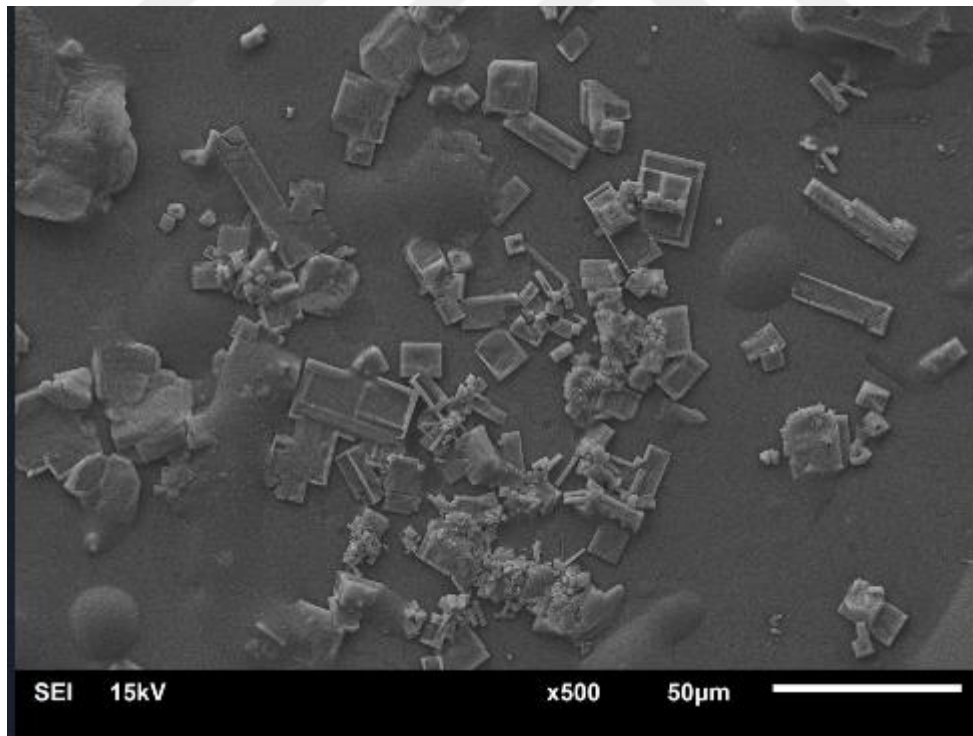
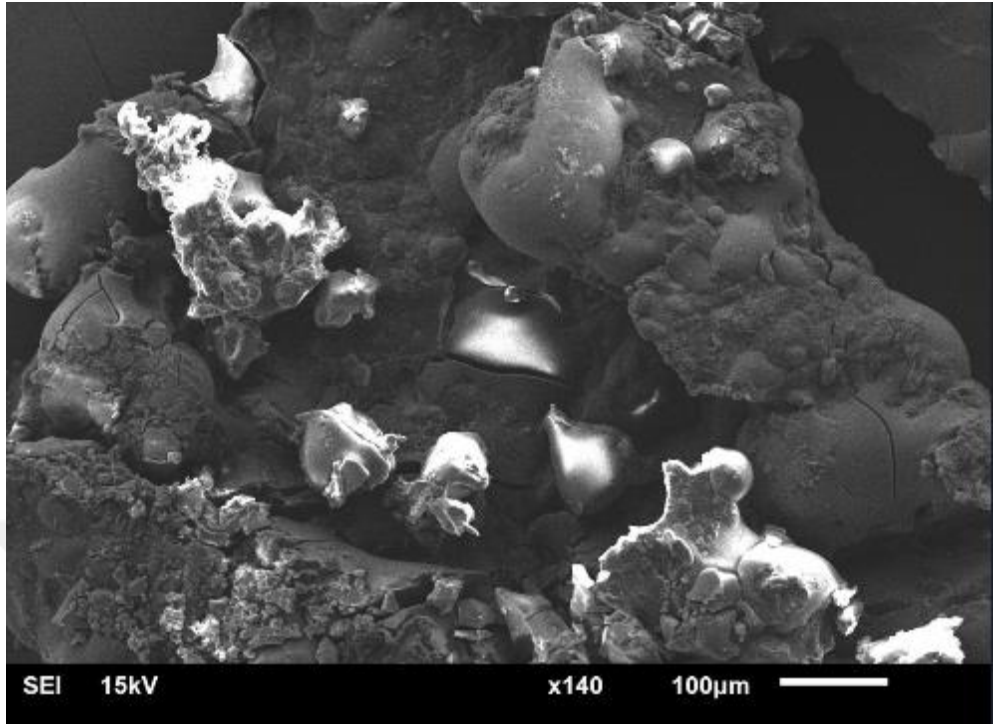
		Sindirim sonrası DK- inülin	Sindirim sonrası DK-pektin	Sindirim sonrası PK-inülin	Sindirim sonrası PK-pektin	Sindirim sonrası IJ
	Fenolik Standartlar (µg/g)					
Fenolik asitler	<u>Hidroksi benzoik asit</u>					
	<i>p</i> -OH Benzoik asit	-	-	5,68	-	101,77
	Vanillik asit	-	-	-	-	-
	Protokatekuik asit	2,46	-	-	-	20,91
	Gallik asit	-	-	-	-	-
	Klorojenik asit	-	-	-	-	-
	Siringik asit	-	-	-	-	-
	Ellajik asit	-	-	-	-	-
	<u>Hidroksi- sinamik asit</u>					
	<i>t</i> -Sinnamik asit	33,83	44,69	39,68	42,80	385,75
	Ferulik asit	735,64	163,72	1004,35	1402,63	1961,52
	<i>p</i> -Kumarik asit	361,07	648,83	517,76	640,01	1433,82
	Kafeik asit	126,91	209,02	148,49	200,62	1430,22
	Kafeik asit fenil ester (CAPE)	42,89	92,94	31,02	84,93	-

Tablo 33'ün devamı;

Flavonoid	<u>Flavonol</u>					
	Ramnetin	-	-	-	-	-
	Kuersetin	-	-	-	-	-
	Rutin	-	-	-	-	-
	Mirisetin	-	-	-	-	-
	Galangin	151,37	144,30	23,47	111,67	72,50
	<u>Flavan-3-ol</u>					
	Epikateşin	-	-	-	-	-
	Kateşin hidrat	-	72,64	-	-	-
	<u>Flavonlar</u>					
	Krisin	115,06	125,40	34,99	114,82	77,70
	Daidzein	-	-	-	-	-
	Apigenin	-	-	-	-	-
	Luteolin	-	-	-	-	-
	<u>Flavanonlar</u>					
	Pinosembrin	194,71	197,99	108,94	158,94	152,20
	Hesperetin	131,58	161,94	123,84	158,33	540,21
	Naringenin	-	-	-	-	-
	(-) tespit edilemedi					

3.5.2. SEM Görüntüleri

Tarama elektron mikroskobu (SEM), sekonder elektronlar ve geri saçılan elektronlar kullanılarak düşükten yükseğe büyütme düzeylerinde kullanılabilen bir tür elektron mikroskobudur (Yoshida vd., 2016). İyonik jelasyonla yapılan propolis-pektin kapsüllerinin SEM görüntüleri 15 kV altında taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yapıldı. Kapsüller, gözenekli pürüzlü ve gözenekli yapılar olduğu gözlemlendi (Şekil 31).



Şekil 31. İyonik jelasyon ile yapılan propolis-pektin kapsüllerinin SEM görüntüleri

4. TARTIŞMA

Ham propolis, arılar tarafından kovandan toplanan ve çeşitli çözücülerle özütlenerek damla, kapsül, tablet, pastil veya film formunda tüketilebilen önemli bir biyoaktif takviye edici ajandır. Sağlık, tıp, eczacılık, kozmetik, tekstil ve boya endüstrilerinde geniş kullanım alanına sahip olan bu doğal bileşiğe yönelik bilimsel ve endüstriyel ilgi giderek artmaktadır.

Propolisin farmakolojik açıdan en değerli fraksiyonu, yüksek oranda polifenol içeren balsamik kısmıdır. Bu fraksiyon, genellikle etanol ile özütlenerek biyoyararlanımı artırılmış bir form elde edilir. Polifenoller bakımından zengin olan bu özüt, güçlü antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve antitümöral özellikler sergilemektedir. Bu biyolojik aktiviteler, propolisin sağlık alanında çeşitli terapötik uygulamalara olan potansiyel katkısını desteklemektedir (El- Maati vd., 2016; Kara vd., 2022; Kung vd., 2022).

Propolis özütlenmesinde en yaygın kullanılan çözücü etanol olmasına rağmen, çevresel sürdürülebilirlik ve sağlık açısından daha güvenli alternatif çözücüler üzerine yapılan araştırmalar giderek artmaktadır. Bu bağlamda, su, bitkisel yağlar ve yeşil çözücüler gibi çevre dostu seçenekler ile etanolden arındırılmış propolis özütleri elde etmek mümkün olmaktadır (Trusheva vd.,F 2019; Tzani vd., 2022).

Çalışmamızda referans olarak hazırlanan %70' lik etanolik propolis çözeltisinin TPC değeri ham propolisin gram başına değerinin $123,91 \pm 0,79$ mg GAE/g olduğu tespit edilmiş, olup, çözeltideki miktarı ise $42,68 \pm 3,20$ mg GAE/mL olarak belirlendi. Referans olarak kullanılan bir diğer özüt, sadece su ile özütlenen sulu propolis özütünde TPC değerinin 6,9 mg GAE/g ve çözeltideki miktar $0,90$ mg GAE/mL olarak bulundu.

Bu doktora tezi kapsamında ve aynı zamanda bir sanayi projesi olarak desteklenen çalışmada, etanol içermeyen ancak etanolik özütlerle biyoyararlanım ve etkinlik açısından benzer özellikler gösterebilen yeşil çözücüler ve kapsülleme yöntemleri kullanılarak ekolojik propolis özütleri ve kapsüllerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda, öncelikli olarak derin ötektik solventler (DÖS) ile çeşitli ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

DÖS'ler, düşük kafes enerjisi ve düşük erime noktalarına sahip, genellikle büyük ve simetrik olmayan iyonlardan oluşan sıvı karışımlardır. Bu çözücüler, çoğunlukla bir kuaterner amonyum tuzunun bir metal tuzu veya hidrojen bağı donörü (HBD) ile birleştirilmesiyle elde edilir. Abbott ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada,

çeşitli kuaterner amonyum tuzları $ZnCl_2$ ile ısıtılmış ve oluşan sıvıların donma noktaları ölçülmüştür. Çalışmada, en düşük erime noktası (23-25 °C) kolin klorür kullanıldığında elde edilmiştir. Daha sonra Smith ve ark. (2014) tarafından yapılan araştırmalar, tuzlar ile hidrojen bağı donörlerinin ötektik karışımlarından oluşan çeşitli sıvıların geliştirilmesine katkı sağlamıştır.

Son yıllarda DÖS'ler, çeşitli biyolojik aktif bileşiklerin ekstraksiyonunda dikkat çeken çözücüler arasında yer almaktadır. Dai ve arkadaşları (2014), şeker bazlı bir DÖS' ün yüksek sıcaklık ve ışık gibi çevresel stres faktörlerine karşı kartamin stabilitesini su ve %40'lık etanol çözeltilerine kıyasla artırdığını raporlamıştır. Benzer şekilde, García ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, sızma zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için yeşil çözücüler kullanılmıştır. Araştırmada, DÖS çözücülerinin farklı polaritelere sahip fenolik bileşikleri çözmede etkili olduğu ve elde edilen ekstraksiyon verimlerinin geleneksel %80'lik metanol/su çözücüsü ile kıyaslanabilir olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, propolis ekstraksiyonunda derin ötektik çözücüler (DÖS) kullanılarak çevre dostu ve etkili özütleme yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kuaterner amonyum tuzu olarak kolin klorür, farklı organik asitler (laktik asit, sitrik asit, askorbik asit) ve prolin ile kombine edilerek çeşitli DÖS karışımları oluşturulmuş ve bu çözücüler kullanılarak propolis özütleri hazırlanmıştır.

Elde edilen propolis özütlerinin fenolik bileşik içeriği toplam fenolik madde miktarı (TPC) analizleri ile belirlenmiş ve farklı DÖS sistemlerinin özütleme verimliliği karşılaştırılmıştır. Böylece, propolisten en yüksek fenolik madde ekstraksiyonunu sağlayan optimum DÖS karışımları belirlenerek, etanol içermeyen alternatif çözücü sistemlerinin etkinliği değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, tek bir propolis örneği kullanılarak farklı çözücülerle elde edilen özütlerin fenolik bileşik içeriği karşılaştırılmıştır. Özütleme verimliliğinin değerlendirilmesi amacıyla, propolis su ve %70'lik etanol çözücülerinde özütlenmiş ve elde edilen toplam fenolik madde (TPC) miktarları analiz edilmiştir.

DeneySEL sonuçlara göre, etanol ile özütlenen propolis ekstraktında TPC miktarı 42,68 mg GAE/mL olarak belirlenirken, su ile özütlenen ekstraktta bu değer 0,90 mg GAE/mL olarak tespit edilmiştir. Her iki özütteki TPC miktarları arasındaki bu belirgin fark, suyun propolis bileşenlerinin ekstraksiyonunda düşük etkinliğe sahip olduğunu, buna karşın etanolün propolis için güçlü bir çözücü olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, literatürde daha önce yapılan çalışmalarla da uyumlu olup, propolis ekstraksiyonunda

etanolün yüksek verimli bir çözücü olduğunu desteklemektedir (Birinci ve Kolaylı, 2024; Kara vd., 2022).

Geleneksel organik çözücülerin çoğu toksiktir ve insan sağlığı için yüksek riskler taşır. Bu bağlamda, derin ötektik çözücüler gibi yeşil çözücüler, özellikle biyomoleküllerin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında organik çözücülerin yerini alabilecek umut verici çevre dostu çözücüler geliştirilmektedir. Literatüre bakıldığında bir başka DÖS ile ilgili çalışmada Barbieri ve arkadaşlarının (2020) biberiye bitkisinin fenolik içeriği için ultrason destekli ekstraksiyon hazırlarken dört kolin klorür bazlı derin ötektik çözücü kullandılar. Gliserol-kolin klorür ile elde edilen ekstrakt en düşük toplam fenolik bileşik değerine sahip olmasına rağmen, tüm DÖS bazlı ekstraktlar alkol ekstraktından daha yüksek antioksidan kapasite sunmuştur.

Kolin klorür ve laktik asit ile 4 farklı deneme deseninde yapılan özütlemelerde en yüksek TPC değerinin 1:10 orandaki DÖS karışımı ile elde edildi. Bu değer etanolik özüte göre düşük ancak, suya göre yaklaşık 10 kat daha yüksek bulundu. Çalışmamıza benzer olarak kolin klorür:laktik asit 80 °C ve 30 dakika 1:1, 1:2, 2:1 ve 1:3 oranlarında çalışmalar yapılmış verilen TPC değerleri mg GAE/ g propolis olarak gösterilmiş (Lazović vd., 2024). Laktik asit ve 1,2- propanediol ile hazırlanan bir başka çalışmada, TPC değerinin 12,5 mg GAE/mL olarak bulunduğu gösterilmiş (Trusheva vd., 2024).

Bu çalışmada, başlangıçta kullanılan laktik asit yerine alternatif bir organik asit olarak sitrik asit tercih edilerek derin ötektik solvent (DÖS) sistemleri ile propolis ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Benzer oranlarda hazırlanan çözücü sistemleri ile yapılan ekstraksiyon deneyleri sonucunda, en yüksek toplam fenolik madde (TPC) miktarının 2,75 mg GAE/mL ile 1:1 oranında hazırlanan DÖS karışımında elde edildiği belirlenmiştir.

Literatürde benzer şekilde, 65°C'de kolin klorür ve betainin, bitartarat ve prolin ile oluşturduğu DÖS sistemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, elde edilen propolis ekstraktlarının TPC değerlerinin 12 ila 52 mg GAE/g arasında değiştiği bildirilmiştir (Alpat vd., 2023). Bu bulgular, farklı DÖS bileşimlerinin fenolik madde ekstraksiyon verimliliğini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Kolin klorür ve propolis ile hazırlanan DÖS karışımlarında en yüksek TPC değerinin 1:10 karışımında ve 2,62 mg GAE/mL olarak tespit edildi.

Yeşil solventler düşük uçuculukları, düşük yanıcılıkları, hızlı biyolojik bozunabilirlikleri ve geri dönüştürülebilirlikleri nedeniyle giderek daha popüler hale gelmiştir. Bunun yanında, yeşil solventler güvenli, uygun maliyetli ve kullanımı kolay

olmasıyla birlikte geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (Smith vd., 2014; Zhang vd., 2012). Cui ve arkadaşları (2018), makro gözenekli reçineler kullanarak başarılı flavonoid ekstraksiyonundan sonra kolin klorür içeren derin ötektik solventlerin geri dönüşümünü incelemiştir. Yüklenen [CC-Cl]-DÖS ekstraksiyon çözeltisini yıkamak için deiyonize su kullanılmıştır. Daha sonra, yıkama suyu ve atık çözelti karıştırılmış ve fazla su, vakum altında basit buharlaştırma yolu ile yüklü [CC-Cl]-DÖS sıvı çözeltisinden uzaklaştırılmıştır. Rejenere edilmiş ve geri dönüştürülmüş [CC-Cl]-DÖS çözeltisi dört defaya kadar mükemmel verimle ekstraksiyon için kullanılmıştır. Bir başka çalışmada Tang ve Row (2020), [CC-Cl]-DÖS ekstraksiyonunun iki aşamalı bir işlem olduğunu, bunun da yüksek polariteye sahip bileşiklerin eşzamanlı ekstraksiyonunun ayrılmasını kolaylaştırdığını ve düşük polariteye sahip bileşikler polarite tabanlı iki aşamalı bir işlemle ekstrakte edip ayırmak için hidrofobik mentol bazlı [CC-Cl]-DÖS kullandığını belirtmiştir.

Bu çalışmada, çevre dostu (green) veya ekolojik çözücüler olarak bazı bitkisel yağların propolis çözünürlüğü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çözücü olarak ayçiçek yağı, susam yağı, fındık yağı ve zeytinyağı kullanılarak ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bitkisel yağlar, hem farmasötik ve kozmetik formülasyonlarda yardımcı madde olarak (Paiva vd., 2014) hem de aktif bileşen taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır (Damavandi vd., 2013).

Deneylerde, ham propolis tozu ve etanolik propolis özütü kullanılmıştır. Ancak, toz propolis ile hazırlanan özütün filtrelenebilmesinin mümkün olmaması nedeniyle çalışmalar etanolik propolis özütünden alkol uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen propolis özü ile devam ettirilmiştir. Ayrıca, yağ içerisindeki propolis çözünürlüğünü artırmak amacıyla bitkisel lesitin kullanılarak farklı denemeler yapılmıştır.

Hazırlanan bitkisel yağlardaki propolis özütlerinde toplam fenolik madde (TPC) miktarı analiz edilmiştir. En yüksek TPC değeri, $13,04 \pm 0,02$ mg GAE/mL ile fındık yağı içeren karışımda elde edilmiştir. Bu karışım, 1,54 g lesitin ve 15 mL fındık yağı içeren bir ekstrakt olarak hazırlanmış ve elde edilen TPC değeri DÖS ile elde edilen özütlerden daha yüksek bulunmuştur. Ayçiçek yağı ile hazırlanan etanolik propolis çözeltisinde ise en yüksek TPC değeri 6,30 mg GAE/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, fındık yağının diğer bitkisel yağlara kıyasla propolis bileşenlerinin çözünürlüğü açısından daha uygun bir çözücü olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, bitkisel yağ bazlı çözücü sistemlerinin propolis özütlenmesinde etkin alternatifler sunabileceğini ve özellikle fındık yağının, fenolik bileşik ekstraksiyonunda yüksek verim sağlayan bir ortam oluşturduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, sulu ortamda propolis özütlerinin toplam fenolik madde (TPC) miktarını artırmak amacıyla bazik çözünürleştirme uygulanmıştır. Bu amaçla, farklı konsantrasyonlarda sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltileri kullanılarak propolis ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve bazik ortamın fenolik bileşik ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda, %1,5 Na_2CO_3 içeren ekstraktın, diğer konsantrasyonlara kıyasla en yüksek toplam polifenol içeriğine sahip olduğu ($6,00 \pm 0,20$ mg GAE/mL) ve toplam flavonoid madde miktarının $2,30 \pm 0,10$ mg QE/g olduğu belirlendi. Çalışmamıza benzer olarak yapılan bir çalışma da pH 8’de alkali ortamda propolisin nötral ortama göre 6 kat attığı, ancak asidik hidroliz ile iki kat arttığı gösterilmiş (Lim vd., 2023). Ancak bu çalışma sonucu elde edilen ürünün pH’ı tüketime uygun olmadığından organik bir asit yardımıyla pH’ı tüketilebilir seviyeye (pH<6) ayarlandı. Bunun için laktik asit, sitrik asit, tartarik ve malik asitler kullanılabileceği gibi, çalışmada %20’lik askorbik asit tercih edildi.

Çalışmada kullanılan propolis özütlerinin biyolojik aktiviteleri, antioksidan kapasiteleri cinsinden belirlendi. Doğal özütlerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem olan FRAP ve DPPH yöntemleri kullanıldı. Demir (III)-TPTZ kompleksini Demir (II)-TPTZ’ye indirgendiği zaman absorbanstaki değişim FRAP değeri olarak belirlenir. Yüksek FRAP değeri yüksek antioksidan aktiviteyi ifade eder. Başlangıçla kullanılan standart etanolik propolis özütünün FRAP değeri $256,16 \mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mL}$ olarak belirlenirken, sulu özütün $86,30 \mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mL}$ bulundu (Grassi vd., 2023; Kolaylı vd., 2023). Derin ötektik solvent karışımı olan kolin klorür:laktik asit (1:10) karışımında FRAP değerinin $198,76 \pm 10,20 \mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mL}$ olarak bulunurken, alkali özütlemde %1,5 Na_2CO_3 propolis özütünde $180,68 \mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mL}$ olarak bulundu. Propolis özütlerindeki antioksidan kapasite TPC ile ilişkili olup, yüksek değere sahip özütlerin yüksek FRAP değerine sahip olduğu görülmektedir. Ancak derin ötektik solvent ve alkali özütleme ile elde edilen propolis özütlerinin, antioksidan değerlerinin, TPC değerine bağlı olması beklenirken, beklenenden daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip oldukları bulundu. Bu bize özütlerdeki her bir polifenolik ajanın eşit antioksidan kapasiteye sahip olmadığını ifade etmektedir. Flavonoidlerce zengin karışımların daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu, ayrıca gallik asit, rutin, kuersetin, pinosembrin ve kafeik asit gibi polifenollerin daha yüksek antioksidan değere sahip olduğu ileri sürülmektedir (Lang vd., 2024; Csepregi vd., 2016). Kolin klorür:sitrik asit, kolin

klorür:prolin ile oluşturulan DÖS karışımlarının toplam antioksidan değerlerinin de TPC miktarlarına bağlı olarak etanolik özütten daha düşük değerler bulundu.

Bitkisel yağlar ile elde edilen propolis özütlerinin, antioksidan test olarak kullanılan bu iki yöntemle göre analiz edilmeye uygun bulunmadığından dolayı antioksidan kapasiteleri ölçülmedi. FRAP ve DPPH yöntemleri sulu ortamlar için uygun olup, yağ bazlı özütlerin antioksidan özellikleri ancak beta-karoten yöntemi gibi yöntemler ile tespit edilmelidir. Ancak, çalışmamızda bu yöntemler kullanılmadığı için, antioksidan yönden değerlendirme yapılmadı. Bu özütlerdeki TPC değerleri de etanol ile özütlenerek elde edildikten sonra ölçüldü. Yağ bazlı örneklerin TPC değerleri düşük olduğu için, farklı bir antioksidan kapasite ölçümü yapılmadı.

Çalışılan RP-HPLC-PDA cihazındaki 26 standart madde analizi için ters faz sisteminde gradiyentle program üzerinde çalışmalar yapıldı. Metot validasyonu için kesinlik, doğruluk, LOD ve LOQ değerleri belirlendi ve her standart için ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizildi. Metot validasyon parametreleri tekrarlanabilirlik, hassasiyet ve doğruluk değerleri literatürdeki yöntemle uygu analiz edildi (Kara ve Birinci, 2024).

Tablo 22’de, etanolik, sulu ve alkali propolis özütlerinin bireysel fenolik bileşik içerikleri HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, sulu propolis özütlerinin fenolik asitler (protokatekuik asit, gallik asit, kafeik asit vb.) açısından daha zengin olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, hidroksisinamik asit türevlerinin her iki çözücü sistemde de özütlendiği, ancak etanol ortamında daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir. Propolisin biyolojik aktivitesinde önemli bir rol oynayan kafeik asidin sulu özütte daha yüksek oranda bulunduğu gözlemlenirken, ester türevi olan kafeik asit fenil ester (CAPE) etanolik özütte belirgin şekilde daha yüksek konsantrasyonda tespit edildi.

Propolisin temel flavonoid bileşenlerinden olan krisin ve pinosembrinin etanolik ekstraktlarda daha yüksek seviyelerde bulunduğu belirlendi. RP-HPLC-DAD analiz sonuçlarına göre, %1,5 Na₂CO₃ içeren propolis ekstraktında krisin miktarının sulu çözeltiye kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla olduğu tespit edildi.

Farklı bitkisel yağ özütleri içerisinde yalnızca fındık yağı ekstraktı RP-HPLC-PDA yöntemi ile analiz edilerek fenolik bileşik profili belirlendi. Yapılan analizlerde, en yüksek konsantrasyonda bulunan fenolik bileşiğin 6084 µg/mL ile mirisetin olduğu tespit edilirken, bunun yanı sıra pinosembrin (2331 µg/mL), ferulik asit (2042 µg/mL), CAPE (1496 µg/mL) ve krisin (379 µg/mL) gibi önemli fenolik bileşikler de belirlendi. Galangin ve ramnetin

findık yağı ekstraktında saptanmazken, kolin klorür+laktik asit içeren derin ötektik solvent (DÖS) sisteminde yüksek miktarda bulunduğu tespit edildi.

Çalışmamızda etanolik propolis özütlerini yenilebilir polimerler kullanarak enkapsüle propolis ürünler hazırlandı. Kapsülleme, aktif maddeleri bir taşıyıcı malzeme içine hapsedme işlemidir. Aynı zamanda, polifenollerin acı tadı ve burukluğu gibi yeme sırasındaki hoş olmayan hisleri maskeleyerek, ayrıca ürünlerin depolama süresinin de uzatılmasında katkı sağladığı için de tercih edilmektedir (Nedovic vd., 2011). Çalışmamızda pektin ve inülin kullanılarak üç farklı kapsülleme tekniğine uygun enkapsüllemeler yapıldı.

Damlatma tekniği olarak da adlandırılan iyonik jelasyon yöntemi ile %3'lük pektin kullanılarak enkapsülasyonlar elde edildi. Bu yöntemin bir cihaz gerektirmemesi, kolay ve maliyeti açısından uygun olması, diğer enkapsülasyon tekniklerine göre oldukça avantaj sağlamaktadır (Keskin vd., 2019). Fakat yüksek ölçekli üretimlerde bu yöntemin kullanılması dezavantajlı olabilmektedir. Pektin negatif yüklü doğal bir polimer olduğu için Ca^{+2} iyonları ile çapraz bağlar oluşturmak suretiyle propolis özütleri ile enkapsülasyon oluşturmaktadır (yumurta kutusu modeli) (McClements ve Li, 2010). İyonik jelasyon tekniğinde kullanılan etanolik propolis özütünün konsantrasyonu ne kadar yüksek ise, enkapsüle üründe bağlanan polifenol miktarı o kadar yüksek bulundu. Yapılan verim hesabına göre elde edilen propolis kapsüllerinde kapsüllenme etkinliği %96 olarak hesaplandı. Elde edilen kapsüllerde yapılan toplam fenolik madde miktarı değeri ise $14,26 \pm 0,02$ mg GAE/mL olarak tespit edildi. Elde edilen kapsüllerin partikül dağılımı incelendiğinde 100 μm ile 2000 μm boyutunda partikül yapısında bulunduğu, 1000 μm ve üzerindeki partiküllerin hacimsel olarak daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir. Favaro-Trindade vd. (2011) yaptıkları kapsülasyon çalışmasında, propolis ekstraktını, izole soya proteini ve pektini kapsülleyici maddeler olarak kullanarak koaservasyon yoluyla elde ettikleri kapsüllerde, kapsülasyon etkinliğini %62,99 belirlemişlerdir. Sahlan ve Supardi (2013), yaptığı çalışmada kullanım özelliklerini iyileştirmek için, Endonezya propolisini bir homojenizatör ve sonikasyon ile muamele ettikten sonra kazein miseli ile kapsüllemiş, mikro ve ultra filtrasyon sistemi ile ayrılarak mikro ve nano partiküller oluşturulmuştur. Bu mikro ve nano partiküller yüksek flavonoid ve orta düzeyde polifenol kapasiteleri sergilemiştir (flavonoidler ve polifenoller için sırasıyla %94 ve %67 kapsülleme etkinliği). Partiküllerin boyutu partikül boyutu analizörü (PSA) ile analiz edilmiş ve partiküllerin ortalama boyutunun 1,3 μm ve 300 nm olduğu gösterilmiştir.

İnülin ve pektin kullanılarak dondurarak ve püskürterek kurutma teknikleri ile kapsülasyon çalışmaları yapıldı. Kapsülasyon etkinlikleri püskürterek kurutma yöntemi ile pektin kullanarak yapıldığında %46,56, inülin ile yapıldığında %50; dondurarak kurutma yöntemi ile yapıldığında pektin kullanınca kapsülasyon etkinliği %44, inülin kullanıldığında %37 olarak tespit edildi. Elde edilen kapsüllerdeki TPC değerleri 100 gramında PK-pektin $7,88 \pm 0,12$ mg, PK-inülin $3,12 \pm 0,12$ mg, DK-pektin $13,33 \pm 0,39$ mg, DK-inülin $3,86 \pm 0,99$ mg olarak hesaplandı. En yüksek değerler pektin ile hazırlanan kapsüllerde gözlemlendi. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma tekniklerine göre iyonik jelasyon da olduğu gibi pektin polimerinin daha uygun olduğu ve kapsülasyon verimlerinin ise yaklaşık %50 olduğu tespit edildi. İyonik jelasyon metodu pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Enkapsülant ile aktif madde homojen bir şekilde karıştırılır ve bir şırınga vasıtasıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl_2 gibi) damlatılır. Burada kullanılan yöntem daha çok kalsiyum-alginat kapsüllerinin elde edilmesinde kullanılan yöntemi taklit ederek uygulandı. Pektin negatif yüklü doğal bir polimer olduğu için Ca^{+2} iyonları ile çapraz bağlar oluşturmak suretiyle propolis özütleri ile enkapsülasyon oluşturmaktadır (yumurta kutusu modeli). İyonik jelasyon tekniğinde CaCl_2 çöktürmesi ile yapılan kapsüllemenin pektin ile çok uyumlu olduğu, ancak inülin ile ürün alınamadığı belirlendi. Pektinle propolis kapsüllerinin granüller halinde parlak renkte olduğu belirlendi. Ayrıca pektin biyopolimerinin her üç enkapsüleme tekniği için çok uygunlu bir kapsülasyon ajanı olarak belirlendi. Literatürde, propolis ekstraktif çözeltisi içeren jelatin mikropartiküller, püskürtmeli kurutma tekniği ile Bruschi ve arkadaşları (2003) tarafından hazırlanmıştır. Yapılan bu çalışmada püskürtmeli kurutma çalışma koşullarının ve jelatin ile mannitol oranlarının optimizasyonu araştırılmış ve topaklanmış mikropartiküller üretmiştir. Mikropartiküllerin propolis için kapsülleme etkinliği mannitol olmadan %41, mannitol ile %39 olarak tespit edilmiştir (Bruschi vd., 2003). Propolis ekstraktı, iki farklı ağırlık oranında (1:4 ve 1:6) taşıyıcı olarak arap zıncı ve oktenil süksinik anhidrit (OSA) nişastası kullanılarak püskürtmeyle kurutulmuş ve boyutları 15 ila 24 μm arasında değişen yuvarlak partiküller üretmiştir (Bodini vd., 2013). Robert ve arkadaşları (2010), nar suyu ve etanolik ekstraktların biyoaktif bileşikleri (polifenoller ve antosiyaninler), kaplama malzemesi ve sıcaklığı dikkate alınarak, 22 istatistiksel faktöriyel tasarım kullanılarak püskürtmeli kurutma yoluyla maltodekstrin (MD) veya soya fasulyesi protein izolatları (SPI) ile kapsüllenmiştir. Bağlanma etkinliklerini %48,5–87,1 arasında bulmuşlardır. Propolis etanolik ekstresi, β -siklodekstrin ile beraber hazırlanarak dondurarak kurutma yoluyla

kapsülasyon çalışması yapılmıştır. Sinnamik ve benzoik asit türevleri gibi nispeten küçük aromatik moleküller için kapsülleme verimliliğinin daha yüksek (%9,4-23,3), terpenik asitler (%5,0-6,7), antrakınonlar (%3,6-8,4) ve flavonoidler (%4,0-10,7) için ise daha düşük olduğu bulunmuştur (Kalogeropoulos vd., 2009).

Kapsül çalışmalarında 5 farklı enkapsüle propolis ürünü içinde % nem değerinin %8 ile 12 arasında değişim gösterdiği belirlendi. En düşük nem içeriğine sahip ürünün (%7,98) püskürterek kurutma tekniği ile elde edilen ve en yüksek dondurarak kurutma tekniği olduğu tespit edildi. En yüksek su aktivitesinin iyonik jelasyon ile üretilen kapsüllerde ve en düşük dondurarak kurutma tekniği ile elde edilen ürünlerde tespit edildi. Enkapsüle örneklerin çözünürlük değerlerinin %89 ile %96 arasında değişim gösterdiği, en yüksek çözünürlük değerine sahip ürünün iyonik jelasyon pektinli üründe olduğu belirlenirken, tüm ürünlerin yüksek çözünürlük değerine sahip olduğu belirlendi. Enkapsülant çalışmalarında pektinle yapılan iyonik jelasyon yöntemiyle elde edilen kapsüllerde partiküller 100 µm ile 2000 µm boyutunda olup yoğunluklu olarak 1000 µm, pektin ile püskürtmeli kurutma yöntemiyle yapılan kapsül boyutları 8-12 µm, inülin ile püskürtmeli kurutma yöntemiyle yapılan kapsül boyutları 5-9 µm, pektin ile dondurarak kurutma yöntemiyle yapılan kapsül boyutları 10-1000 µm arasında olup yoğunlukla 500 µm arasında, inülin ile dondurarak kurutma yöntemiyle yapılan kapsül boyutları 10-1000 µm arasında olup çoğunluğu 100-500 µm arasında partikül ölçümleri gözlemlendi. Kalogeropoulos ve arkadaşları (2009) yaptığı çalışmada maltodekstrin kullanarak elde ettiği kapsüllerde kapsül boyutları 175 nm olduğu belirtilmiştir. Koaservasyon yöntemiyle alginat ve jelatin kullanarak propolis ekstraktında enkapsülasyon çalışması yapan Onbas (2016), çalışmasında kapsüllerinin boyutlarını 22-36 mikron arasında değiştiğini belirtmiştir. Aynı şekilde propolis ekstraktlarını kalsiyum alginat ve kitosan kullanarak enkapsülasyon çalışan Guo ve arkadaşları (2016), kapsüllerinin boyutlarını 265 nm olduğunu belirtmiştir. Enkapsülasyon metotlarında kullanılan tekniğe göre kapsül boyutları değişmektedir. Çalışmamızda elde edilen kapsüllerin boyutlarının literatürde belirtilen değerlere göre uyumlu olduğu görülmektedir. Kapsüllerin sindirim özellikleri in vitro sindirim simülasyonu Ozkan ve ark. (2022) ve Sessa ve ark. (2011) tarafından önerilen yöntemlerindeki bazı modifikasyonlar uygulanarak yapıldı. Kapsüllerin biyoyararlılık değerleri %40 ile %90 arasında değişim gösterdiği tespit edilirken en yüksek değer %91 ile en yüksek iyonik jelasyon ile elde edilen kapsüle ait olduğu belirlendi. Daha sonra pektinle yapılan dondurarak kurutma tekniği ile elde edilen kapsüllerin %81'lik biyoyararlılık değerine sahip olduğu tespit edilirken, inülin ile yapılan kapsüllerde en düşük

değere sahip olduğu belirlendi. Elde edilen tüm kapsüllerde RP-HPLC-PDA fenolik analizi yapıldı. Tüm kapsüller %70'lik etanol ile özütlendi ve elde edilen etanolik özütler sıvı-sıvı özütlemeye tabi tutulduktan sonra HPLC'de yürütüldü. 26 adet fenolik standarda göre yapılan özütleme sonucunda hidroksibenzoik asit sınıfına ait toplam 7 fenolik bileşenin tayin limitleri altında kaldığı saptandı. Kapsüllerin tümünde hidroksi-sinamik asit türevlerince zengin olduğu belirlendi. Bu sınıftan kumarik asit en yüksek bulunmakla beraber ferulik asit değerleri de yüksek olup, iyonik jelasyon ile yapılan kapsüllerde en yüksek sonuçlar tespit edilmiştir. Flavonol grubundan galangince zengin, flavonlar grubundan ise pinosembrin ve hesperetince zengin bulundu. Kapsüllerin sindirim özellikleri *in vitro* sindirim simülasyonu Ozkan ve ark. (2022) ve Sessa ve ark. (2011) tarafından önerilen yöntemlerindeki bazı modifikasyonlar uygulanarak yapıldı. Kamimori ve arkadaşları (2002), sakız ve kapsül formülasyonundan kafeinin emilim oranını ve göreceli biyoyararlanımını değerlendirmiştir. Yapılan çalışmada sakız formülasyonunun 50, 100 ve 200 mg'lık dozlardan ölçülen değerlerde biyoyararlanımı sırasıyla %64, 74 ve 77'dir. Yaptığımız çalışmada kapsüllerin biyoyararlılık değerleri %40 ile %90 arasında değişim gösterdiği tespit edilirken en yüksek değerin %91 ile en yüksek iyonik jelasyon ile elde edilen kapsüle ait olduğu belirlendi. Daha sonra pektinle yapılan dondurarak kurutma tekniği ile elde edilen kapsüllerin %81'lik biyoyararlılık değerine sahip olduğu tespit edilirken, inülin ile yapılan kapsüllerde en düşük değere sahip olduğu belirlendi.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada Anadolu propolisi etanolik, sulu, derin ötektik solventler ve bitkisel yağlar ile propolis özütleri hazırlandı. Farklı solvent veya solvent sistemlerinin kalite kriterleri toplam fenolik madde (TPC), antioksidan kapasite, HPLC ile fenolik bileşen içeriği ölçüldü. En yüksek fenolik madde ve ona bağlı olarak tespit edilen özütlemenin %70'lik etanolik özütlemeye ait olduğu bulundu. Farklı oran ve türden çalışılan DÖS karışımlarında en yüksek TPC ve antioksidan değerine sahip karışımın kolin klorür + laktik asit (1:10) olduğu bulundu. Sudaki çözünürlüğü düşük olan propolisin, alkali ortamdaki çözünürlüğünün daha yüksek olduğu tespit edildi. Pektin ile yapılan iyonik jelasyon tekniğine uygun propolis kapsüllerinin yüksek fenolik bileşen bağlama kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Kapsüllerin biyoyararlılık değerleri hesaplandığında en yüksek değer iyonik jelasyon ile elde edilen pektin kapsüllerine ait olduğu belirlendi. Dondurarak kurutma yöntemi ile yapılan kapsüllerde de pektinle yapılan kapsüllerin biyoyararlılık değerinin en yüksek olduğu tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Çevreye zarar vermeyen, sürdürülebilir bir döngü ve en önemlisi insan sağlığı için toksik olan çözücüler yerine yeşil çözücüler tasarlanmalı ve üretilmelidir. Bu çözücülerin kullanımı için çalışmalara olabildiğince katkı sağlamak ve bu konularda araştırmalar yapmak gerekmektedir. Propolisin en iyi çözücüsü etil alkol olduğu bilinen bir durum olmasına rağmen, derin ötektik çözeltiler ile farklı kombinasyonlar ile çalışmalar yapılmalıdır.

Kapsülasyon çalışmalarında pektin kullanılmıştır. Daha farklı çözeltilerde hazırlanıp kapsülant yapımı denenebilir. Kapsülasyon çalışması sırasında yapılan biyoyararlılık testleri için *in vivo* ortamda hayvan deneyleri ile yapılmalıdır. Etkin dozun ne olduğu ve bu etkinin geçici olup olmadığı değerlendirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 70-71.
- Abinden, P., Deladino, L., Navarro, A., Amaly, J. & Martino, M. (2011). Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions Between Active Compound Encapsulation Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1, 80-87.
- Acosta, E., (2009). Bioavailability of Nanoparticles in Nutrient and Nutraceutical Delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, (14), 3–15.
- Alpat, U., Nar, T., Karasu, S., & Sagdic, O. (2023). Optimization of Propolis Extraction with Natural Deep Eutectic Solvents Using Central Composite Design. *Phytochemistry Letters*, 58, 49-59.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M. & Khan, H. (2019). Composition and Functional Properties of Propolis (bee glue): a Review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7):1695–1703.
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, And Potential Uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- BALTACIOĞLU, C., & YETİŞEN, M. (2021). Püskürtmeli Kurutma Tekniği ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı: Gıda İşleme Teknolojisi. *Journal of Agriculture, Food, Environment and Animal Sciences*, 2(2), 163-189.
- Barbieri, J. B., Goltz, C., Cavaleiro, F. B., Toci, A. T., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2020). Deep Eutectic Solvents Applied in the Extraction and Stabilization of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Phenolic Compounds. *Industrial Crops and Products*, 144, 112049.
- Basta, A. H., El-Saied, H., & Lotfy, V. F. (2013). Performance of Rice Straw-based Composites Using Environmentally Friendly Polyalcoholic Polymers-based Adhesive System. *Pigment & Resin Technology*, 42(1): 24-33.
- Benhanifia, M. & Mohamed, M. W. (2015). Phenolics Constituents of Different Types of Propolis and their Antimicrobial Activities. *Anti-Infective Agents*, 13(1):17-27.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in Enzymology*, Vol. 299, 15-27.

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *In Methods in Enzymology*, Vol. 299, 15-27.
- Bodini, R. B., Sobral, P. D. A., Fávaro-Trindade, C. S., & Carvalho, R. D. (2013). Properties of Gelatin-Based Films with Added Ethanol–Propolis Extract. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 104-110.
- Bogdanov, S. (1997). *Antibacterial substances in honey*. Artikel Swiss Bee Research Centre, İsviçre.
- Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremião, M. P. D. (2003). Gelatin Microparticles Containing Propolis Obtained by Spray-Drying Technique: Preparation and Characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264(1-2), 45-55.
- Caballo, C., Sicilia, M. D., & Rubio, S. (2017). Supramolecular Solvents for Green Chemistry. *In The application of green solvents in separation processes* (pp. 111-137).
- Cacicedo, M. L., Islan, G. A., Drachemberg, M. F., Alvarez, V. A., Bolzán, A. D. & Castro, G. R. (2018). Hybrid Bacterial Cellulose–Pectin Films for Delivery of Bioactive Molecules. *New Journal of Chemistry*, 42, 7457-7467.
- Calvo-Flores, F. G., Monteagudo-Arrebola, M. J., Dobado, J. A., & Isac-García, J. (2018). Green and Bio-Based Solvents. *Topics in Current Chemistry*, 376(3).
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S. & Fabiano Tixier, A. S. (2019). Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules*, 24(16), 3007.
- Chemat, F., Vian, M. A. & Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2019). Green Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Products Using Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents. *Current Opinion in Food Science*, 26, 87-93.
- Chugh, N. A., Bali, S., & Koul, A. (2018). Integration of Botanicals in Contemporary Medicine: Road Blocks, Checkpoints and Go-ahead signals. *Integrative Medicine Research*, 7(2), 109-125..
- Clarke, C. J., Tu, W. C., Levers, O., Bröhl, A., & Hallett, J. P. (2018). Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chemical Reviews*, 118(2), 747–800.
- Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7,2, 66-76.

- Corcoran, M. P., McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2012). Flavonoid Basics: Chemistry, Sources, Mechanisms of Action, and Safety. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 31(3), 176–189.
- Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M., & Hideg, É. (2016). Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules*, 21(2), 208.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., & Dyatmiko, W. (1997). Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80(4), 1144-1152.
- Da Rosa, C., Bueno, I. L., Quaresma, A. C. M., & Longato, G. B. (2022). Healing Potential of Propolis in Skin Wounds Evidenced by Clinical Studies. *Pharmaceuticals*, 15(9), 1143.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68.
- Damavandi, R. D., Egtesadi, S., Shidfar, F., Heydari, I., & Foroushani, A. R. (2013). Effects of Hazelnuts Consumption on Fasting Blood Sugar and Lipoproteins in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(4), 314.
- Davis, S. J. (2015). *Deep Eutectic Solvents Derived from Inorganic Salts*. Leicester Üniversitesi, Doktora Tezi, Leicester.
- De Groot, A. C. (2013). Propolis: A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects. *Dermatitis*, 24(6), 263-282.
- De Jong, E., Higson, A., Walsh, P., & Wellisch, M. (2012). Product Developments in the Bio-based Chemicals Arena. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(6), 606-624.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for Preservation of Functionality and Targeted Delivery of Bioactive Food Components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Dezmirean, D. S., Paşca, C., Moise, A. R., & Bobiş, O. (2020). Plant Sources Responsible for the Chemical Composition and Main Bioactive Properties of Poplar-type Propolis. *Plants*, 10(1), 22.
- El-Maati, M. F. A., Mahgoub, S. A., Labib, S. M., Al-Gaby, A. M., & Ramadan, M. F. (2016). Phenolic Extracts of Clove (*Syzygium aromaticum*) with Novel Antioxidant and Antibacterial Activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(4), 494-504.
- Eser, B., & Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51-57.

- Fang, Z. & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of Polyphenols: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., & Marrucho, I. M. (2014). Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(10), 2416–2425.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A., & Aguiar, C. (2010). How do Bees Prevent Hive Infections? The Antimicrobial Properties of Propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48,8, 3597-3604.
- Gaserod, O., Smidsrod, O. & Skjask-Brñk, G. (1998). Microcapsules of Alginate-Chitosan—I: A Quantitative Study of the Interaction Between Alginate and Chitosan. *Biomaterials*, 19, 1815-1825.
- George, M. & Abraham, T.E. (2006). Polyionic Hydrocolloids for the Intestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan: A Review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1–14.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. & Saurel, R. (2007). Application of Spray-drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Gonnet, M., Lethuaut, L. & Boury, F. (2010). New Trends in Encapsulation of Liposoluble Vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, 276-290.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330–347.
- Grassi, G., Capasso, G., Gambacorta, E., & Perna, A. M. (2023). Chemical and Functional Characterization of Propolis Collected from Different Areas of South Italy. *Foods*, 12(18), 3481.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- Guler, H. I., Tatar, G., Yildiz, O., Belduz, A. O., & Kolayli, S. (2021). Investigation of Potential Inhibitor Properties of Ethanolic Propolis Extracts Against ACE-II Receptors for COVID-19 Treatment by Molecular Docking Study. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3557–3564.
- Gupta, D. (2015). Methods for Determination of Antioxidant Capacity: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546.
- Hamilton, R. J., & Sewell, P. A. (1982). Introduction to High Performance Liquid Chromatography. *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, 1–12.

- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M. & Sangoro, J. R. (2020). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232-1285.
- Hepşen, İ. F., Tilgen, F., & Er, H., 1996. *Propolis: Tıbbi özellikleri ve Oftalmolojik Kullanımı*. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 3,4, 386-391.
- Horvath, I. T., & Anastas, P. T. (2007). Innovations and Green Chemistry. *Chemical Reviews*, 107(6), 2169-2173.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Isildak, Ö., Yildiz, I., Genç, N., Sabancı, D., & Işildak, İ. (2023). New Potentiometric PVC Membrane Electrode for Ferric Reduction Antioxidant Power Assay. *Food Chemistry*, 423, 136261.
- Jing, X., Wu, J., Wang, H., Feng, J., Zheng, X., Wang, X., & Wang, S. (2022). Bio-derived Solvent-based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Smartphone Digital Image Colorimetry for the Detection of Carbofuran in Cereals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104782.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Mourtzinou, I., Troullidou, E., Chiou, A., & Karathanos, V. T. (2009). Encapsulation of Complex Extracts in β -cyclodextrin: An Application to Propolis Ethanolic Extract. *Journal of Microencapsulation*, 26(7), 603-613.
- Kapare, H. S., & Sathiyarayanan, L. (2020). Nutritional and Therapeutic Potential of Propolis: A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(7), 3545-3549.
- Kara, Y. (2020). *Fenolik Bileşiklerin RP-HPLC-PDA İle Analiz Yöntemi Geliştirilmesi, Validasyonu ve Etanolik Propolis Özütlere Uygulanması*. K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Kara, Y., & Birinci, C. (2024). Usability of the Phenolic Profile Analysis Method Developed in RP-HPLC-PDA in Natural Products. *Journal of Apitherapy and Nature*, 7(1), 14-27.
- Kara, Y., Can, Z., & Kolaylı, S. (2022). What Should be the Ideal Solvent Percentage and Solvent-propolis Ratio in the Preparation of Ethanolic Propolis Extract?. *Food Analytical Methods*, 15(6), 1707-1719.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60.
- Karasawa, M. M. G., & Mohan, C. (2018). Fruits as Prospective Reserves of Bioactive Compounds: A Review. *Natural Products and Bioprospecting*, 8(5), 335–346.
- Kasote, D. M. (2017). Propolis: A Neglected Product of Value in the Indian Beekeeping Sector. *Bee World*, 94(3), 80-83.

- Kasprzak, M. M., Erxleben, A., & Ochocki, J. (2015). Properties and Applications of Flavonoid Metal Complexes. *RSC Advances*, 5(57), 45853–45877.
- Kayaoglu, G., Ömürlü, H., Akca, G., Gürel, M., Gençay, Ö., Sorkun, K., & Salih, B. (2011). Antibacterial Activity of Propolis Versus Conventional Endodontic Disinfectants Against *Enterococcus Faecalis* in Infected Dentinal Tubules. *Journal of Endodontics*, 37(3), 376-381.
- Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., & Borsari, B. (2003). Phenolic Cycle in Plants and Environment. *Journal of Cell Molecular Biology*, 2(1), 13-18.
- Keskin, M. (2018). *Propolis ve Özütlerrinin Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi ve Enkapsülasyonu*. K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Keskin, M., Keskin, Ş., & Kolaylı, S. (2019). Preparation of Alcohol Free Propolis-Alginate Microcapsules, Characterization and Release Property. *Lwt*, 108, 89-96.
- Keskin, M., ve Kolaylı, S. (2018). Propoliste Standardizasyon Mümkün Mü? *Uludag Bee Journal*, 18,2.
- Knez, Ž., Markočič, E., Leitgeb, M., Primožič, M., Hrnčič, M. K., & Škerget, M. (2014). Industrial Applications of Supercritical Fluids: A Review. *Energy*, 77, 235-243.
- Kolaylı, S. (2024). A Miracle Food Supplement Obtained from Beehives: Propolis, *Herbs and Spices - New Perspectives in Human Health and Food Industry*, 296.
- Kolaylı, S., & Birinci, C. (2024). A Comparative Study of Solvent Effect on Propolis Extraction by Ultrasound-assisted Extraction. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*, 6(1), 11-17.
- Kolaylı, S., Kazaz, G., Özkök, A., Keskin, M., Kara, Y., Demir Kanbur, E., & Ertürk, Ö. (2023). The Phenolic Composition, Aroma Compounds, Physicochemical and Antimicrobial Properties of *Nigella Sativa* L.(black cumin) Honey. *European Food Research and Technology*, 249(3), 653-664.
- Krell, R. (1996). *Value-added Products from Beekeeping*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity of Propolis of Different Geographic Origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
- Kung, Y. C., Chua, L. S., Yam, M. F., & Soo, J. (2022). Alkaline Hydrolysis and Discrimination of Propolis at Different pH Values Using High Throughput 2D IR Spectroscopy and LC-MS/MS. *Bioresource Technology Reports*, 18, 101120.
- Kurek-Górecka, A., Kłósek, M., Pietsz, G., Czuba, Z. P., Kolaylı, S., Can, Z., & Olczyk, P. (2023). The Phenolic Profile and Anti-inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Polish Propolis on Activated Human Gingival Fibroblasts-1 Cell Line. *Molecules*, 28(22), 7477.

- Lang, Y., Gao, N., Zang, Z., Meng, X., Lin, Y., Yang, S., & Li, B. (2024). Classification and Antioxidant Assays of Polyphenols: A Review. *Journal of Future Foods*, 4(3), 193-204.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Quideau, S., & Treutter, D. (2009). Plant Phenolics-Secondary Metabolites with Diverse Functions. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 1, 1-35.
- Lazović, M. Č., Jović, M. D., Petrović, M., Dimkić, I. Z., Gašić, U. M., Opsenica, D. M. M., Trifković, J. Đ. (2024). Potential Application of Green Extracts Rich in Phenolics for Innovative Functional Foods: Natural Deep Eutectic Solvents as Media for Isolation of Biocompounds from Berries. *Food & Function*, 15(8), 4122-4139.
- Leroy, E., Jacquet, P., Coativy, G., Laure Reguerre, A., & Lourdin, D. (2012). Compatibilization of Starch–zein Melt Processed Blends by an Ionic Liquid Used as Plasticizer. *Carbohydrate Polymers*, 89(3), 955-963.
- Li, Y., & McClements, D. J. (2011). Controlling Lipid Digestion by Encapsulation of Protein-stabilized Lipid Droplets within Alginate–Chitosan Complex Coacervates. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1025-1033.
- Li, Y., Hu, M., Du, Y., Xiao, H., & McClements, D. J. (2011). Control of Lipase Digestibility of Emulsified Lipids by Encapsulation within Calcium Alginate Beads. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 122-130.
- Li, Z., Smith, K. H., & Stevens, G. W. (2016). The Use of Environmentally Sustainable Bio-derived Solvents in Solvent Extraction Applications: A Review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24(2): 215-220.
- Lim, J. R., Chua, L. S., & Soo, J. (2023). Untargeted Mass Spectral Profiling of Water Soluble Propolis Extracts from Acid and Alkaline Hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 52, 102816.
- Maiti, S., Ray, D., Mitra, D., & Mukhopadhyay, A. (2013). Isolation and Characterisation of Starch/Polyvinyl Alcohol Degrading Fungi from Aerobic Compost Environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, 9-12.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic Acids Act as Signaling Molecules in Plant-Microbe Symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359-368.
- Marcus, Y., & Marcus, Y. (2019). *Applications of Deep Eutectic Solvents* (pp. 111-151). Springer International Publishing.
- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured Biopolymer-Based Delivery Systems for Encapsulation, Protection, and Release of Lipophilic Compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865-1880.
- Matsuda, H., Hirota, Y., Kurihara, K., Tochigi, K., & Ochi, K. (2013). Liquid–liquid Equilibria Containing Fluorous Solvents as Environmentally Benign Solvent. *Fluid Phase Equilibria*, 357, 71-75.

- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., & Looi, C. Y. (2017). Applications of Deep Eutectic Solvents in Biotechnology and Bioengineering-Promises and Challenges. *Biotechnology Advances*, 35(2), 105-134.
- McClements, D. J. (2009). Structural Design Principles for Improved Food Performance: Nanolaminated Biopolymer Structures In Foods. *Micro/Nanoencapsulation of Active Food Ingredients*, 1, 3-34.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Structured Emulsion-Based Delivery Systems: Controlling the Digestion and Release of Lipophilic Food Components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213-228.
- Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2020). The Perspectives of Natural Deep Eutectic Solvents in Agri-Food Sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2564-2592.
- Moradi, A., Nezamoleslami, S., Clark, C. C., Sohouli, M. H., & Ghiasvand, R. (2022). The Association Between Dietary Total Antioxidant Capacity with Risk of Rheumatoid Arthritis in Adults: A case-control study. *Clinical Nutrition ESPEN*, 51, 391-396.
- Morón-Ortiz, Á., Mapelli-Brahm, P., & Meléndez-Martínez, A. J. (2024). Sustainable Green Extraction of Carotenoid Pigments: Innovative Technologies and Bio-Based Solvents. *Antioxidants*, 13(2), 239.
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; A Review. *Pharmaceutics*, 3, 793-829.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan Coated Alginate Beads for the Survival of Microencapsulated *Lactobacillus Plantarum* in Pomegranate Juice. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1281-1287.
- Oniszczyk, A., Olech, M., Oniszczyk, T., Wojtunik-Kulesza, K., & Wójtowicz, A. (2019). Extraction Methods, LC-ESI-MS/MS Analysis of Phenolic Compounds and Antiradical Properties of Functional Food Enriched with Elderberry Flowers or Fruits. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 4719-4730.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on Products of Browning Reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-315.
- Ozkan, G., Kostka, T., Dräger, G., Capanoglu, E., & Esatbeyoglu, T. (2022). Bioaccessibility and Transepithelial Transportation of Cranberrybush (*Viburnum opulus*) Phenolics: Effects of Non-thermal Processing and Food Matrix. *Food Chemistry*, 380, 132036.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071.

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An Overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(1), 1259510.
- Peleg, M. (1977). Flowability of Food Powders and Methods for its Evaluation—a Review. *Journal of Food Process Engineering*, 1(4), 303-328.
- Pena-Pereira, F., & Namieśnik, J. (2014). Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: Sustainable Solvents for Extraction Processes. *ChemSusChem*, 7(7), 1784-1800.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2008). Antioxidant Capacity of Dietary Polyphenols Determined by ABTS Assay: A Kinetic Expression of the Results. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:185-191.
- Pietta, P., G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Pirozzi, A., Capuano, R., Avolio, R., Gentile, G., Ferrari, G., & Donsì, F. (2021). O/W Pickering Emulsions Stabilized with Cellulose Nanofibrils Produced Through Different Mechanical Treatments. *Foods*, 10(8), 1886.
- Pizzi, A., & Tekely, P. (1995). Mechanism of Polyphenolic Tannin Resin Hardening by Hexamethylenetetramine: CP–MAS ¹³C-NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, 56(12), 1645-1650.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019). Application of Propolis in Antimicrobial and Antioxidative Protection of Food Quality—A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 53-62.
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., & Chinou, I. (2017). Characterization and Biological Evaluation of Propolis From Poland. *Molecules*, 22(7), 1159.
- Popovic, B. M., Micic, N., Potkonjak, A., Blagojevic, B., Pavlovic, K., Milanov, D., & Juric, T. (2022). Novel Extraction of Polyphenols from Sour Cherry Pomace using Natural Deep Eutectic Solvents—Ultrafast Microwave-assisted NADES Preparation and Extraction. *Food Chemistry*, 366, 130562.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. (2001). Medallion Laboratories Analytical Progress: Antioxidant Activity. *Takes You into the Heart of a Giant Resource*, 19(2), 1-4.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.

- Quintanilla-Carvajal, M. X., Camacho-Díaz, B. H., Meraz-Torres, L. S., Chanona-Pérez, J. J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Aparicio, A., & Gutiérrez-López, G. F. (2010). Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing. *Food Engineering Reviews*, 2, 39-50.
- Radić, B., Radić, S., Mašek, T., & Šuran, J. (2024). Anti-wrinkle Efficacy of Standardized Phenolic Acids Polymer Extract (PAPE) from Propolis: Implications for Antiaging and Skin Health. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 23(10), 3372-3381.
- Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic Acids from Vegetables: A Review on Processing Stability and Health Benefits. *Food Research International*, 136, 109298.
- Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., & Tong, Q. (2019). Pectin Polymers as wall Materials for the Nano-encapsulation of Bioactive Compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 35-46.
- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2019). Spray Drying Encapsulation of Elderberry Extract and Evaluating the Release and Stability of Phenolic Compounds in Encapsulated Powders. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 1381-1394.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Russell, K. M. (1983). *The Antibacterial Properties of Honey*. The University of Waikato. Doktora Tezi, Yeni Zelanda.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512-531.
- Saini, S., Tuli, H. S., Saini, R. V., Saini, A. K., Sak, K., Kaur, D., & Chauhan, A. (2024). Flavonoid-Mediated Suppression of Tumor Angiogenesis: Roles of Ang-Tie/PI3K/AKT. *Pathophysiology*, 31(4), 596-607.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Compuestos Polifenólicos: Estructura y Clasificación. Presencia en Alimentos y Consumo. Biodisponibilidad y Metabolismo. *Alimentaria*, (329), 19-27.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G., & Donsì, F. (2011). Evaluation of the Stability and Antioxidant Activity of Nanoencapsulated Resveratrol During in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12352-12360.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 501-547.

- Shi, M., Zhang, Z., & Yang, Y. (2013). Antioxidant and Immunoregulatory Activity of Ganoderma Lucidum Polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 200–206.
- Shi, P., He, P., Teh, T.K.H., Morsi, Y.S. ve Goh, J.C.H., (2011). Parametric Analysis of Shape Changes of Alginate Beads. *Powder Technology*, 210, 60-66.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities that can be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 206439.
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and Bee Health: The Natural History and Significance of Resin use by Honey Bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311.
- Simone-Finstrom, M., Borba, R. S., Wilson, M., & Spivak, M. (2017). Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects*, 8(2), 46.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A., (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16,3, 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *In Methods in enzymology*, Vol. 299, pp. 152-178.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.
- Sootitawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., Forsell, P., Partanen, R., & Linko, P. (2004). Effect of Water Activity on the Release Characteristics and Oxidative Stability of D-limonene Encapsulated by Spray Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1269-1276.
- Sriamornsak, P., (1999). Effect of Calcium Concentration, Hardening Agent and Drying Condition on Release Characteristics of Oral Proteins from Calcium Pectinate Gel Beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 221–227.
- Stuper-Szablewska, K., & Perkowski, J. (2019). Phenolic Acids in Cereal Grain: Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Role in Living Organisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 664–675.
- Talla, E., Tamfu, A. N., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F. P., Mbafor, J. T., & Ndjouenkeu, R. (2014). Phytochemical Screening, Antioxidant Activity, Total Polyphenols and Flavonoids Content of Different Extracts of Propolis from Tekel (Ngaoundal, Adamawa region, Cameroon). *The Journal of Phytopharmacology*, 3(5), 321-329.
- Toprakçı, İ., Torun, M., & Şahin, S. (2023). Encapsulation of Plum Biowaste Extract: Design of Alginate Beads by Response Surface Approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2676-2687.

- Torres-Valenzuela, L. S., Ballesteros-Gómez, A., & Rubio, S. (2019). Green Solvents for the Extraction of High Added-Value Compounds from Agri-food Waste. *Food Engineering Reviews*, 12(1), 83–100.
- Trusheva, B., Petkov, H., Chimshirova, R., Popova, M., Dimitrova, L., Zaharieva, M. M., & Bankova, V. (2024). Insight into the Influence of Natural Deep Eutectic Solvents on the Extraction of Phenolic Compounds from Poplar type Propolis: Composition and in vitro Biological Activity. *Heliyon*, 10(7).
- Trusheva, B., Petkov, H., Popova, M., Dimitrova, L., Zaharieva, M., Tsvetkova, I., & Bankova, V. (2019). Green Approach to Propolis Extraction: Natural Deep Eutectic Solvents. *Comptes Rendus l'Academie Bulg. Sci*, 72, 897-905.
- Tzani, A., Pitterou, I., Divani, F., Tsiaka, T., Sotiroidis, G., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2022). Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-extracts in Cosmetic Formulation. *Sustainable Chemistry*, 4(1), 8-25.
- Vazhacharickal, P. J. (2021). A Review on Health Benefits and Biological Action of Honey, Propolis and Royal Jelly. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 9(5), 1-13.
- Viktor Nedovica, A. K. (2011). An Overview of Encapsulation Technologies for Food. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Visser, A. E., Swatloski, R. P., & Rogers, R. D. (2000). pH-dependent Partitioning in Room Temperature Ionic Liquids Provides a Link to Traditional Solvent Extraction Behavior. *Green Chemistry*, 2(1), 1-4.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), R117-R124.
- Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L., & Li, B. (2011). Preparation and Characterisation of Octenyl Succinate Starch as a Delivery Carrier for Bioactive Food Components. *Food Chemistry*, 126(3), 1218-1225.
- Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh Tran, T., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*, 6(2), 26.
- Welton, T. (1999). Room-temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chemical Reviews*, 99(8), 2071-2084.
- Widjaja, A., Yeh, T. H., & Ju, Y. H. (2008). Enzymatic Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39(5), 413-418.
- Yoshida, A., Kaburagi, Y., & Hishiyama, Y. (2016). Scanning Electron Microscopy. *Materials Science and Engineering of Carbon*, 71–93.

- Yuan, J. F., Zhang, Z. Q., Fan, Z. C., & Yang, J. X. (2008). Antioxidant Effects and Cytotoxicity of Three Purified Polysaccharides from *Ligusticum Chuanxiong* Hort. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 822-827.
- Zein El Abedin, S., & Endres, F. (2007). Ionic Liquids: The Link to High-Temperature Molten Salts? *Accounts of Chemical Research*, 40(11), 1106-1113.
- Zhang, C. P., Zheng, H. Q., & Hu, F. L. (2011). Extraction, Partial Characterization, and Storage Stability of β -glucosidase from Propolis. *Journal of Food Science*, 76(1), C75-C79.
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108-7146.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients an Food Processing*, 3-29.

ÖZGEÇMİŞ

Pelin KILIÇARSLAN, ilköğrenimini 24 Şubat İlköğretim Okulu'nda bitirdikten sonra lise eğitimini 2009 yılında Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2009-2010 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde lisans eğitimine başladı. 10.01.2015 yılında bölümden mezun oldu. Aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim dalında Biyokimya dalında tezli yüksek lisans programına başladı. 2016 yılında Polonya'da Jagiellonian University'de yüksek lisansa devam etti. 15.12.2017 yılında yüksek lisansı bitirdi. 'Pelajik ve bentik balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz aktivitelerinin irdelenmesi' başlıklı yüksek lisans tezini sunmasının 2019 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Dalında doktorasına başladı. Doğsan Surgical firmasında Kalite Kontrol'de çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir. Evli ve bir çocuk annesidir.