

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**POTANSİYEL BİR İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK
PROPOLİS İÇEREN NİOZOMLARIN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Fulden ULUCAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.02.07

Sunuş Tarihi: 01.10.2014

Bornova-İZMİR

2014

Fulden ULUCAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan ‘‘POTANSİYEL BİR İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK PROPOLİS İÇEREN NİÖZOMLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU’’ başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.10.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Raportör Üye : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Üye : Doç. Dr. Yiğit UYANIKGİL

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Potansiyel Bir İlaç Etkin Maddesi Olarak Propolis İçeren Niozomların Hazırlanması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

..... / / 2014

İmzası

Adı-Soyadı

Fulden ULUCAN

ÖZET**POTANSİYEL BİR İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK PROPOLİS
İÇEREN NİOZOMLARIN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

ULUCAN, Fulden

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Ekim, 2014, 141 sayfa

Bu tezde, geniş biyolojik aktivite spektrumuna sahip doğal bir aktif ürün olan propolisin uygulama zorluklarının üstesinden gelebilmek, biyoyararlanımını arttırmak üzere enkapsüle edilmesi amaçlanmıştır. Enkapsülasyon, propolisin sert ve hoş olmayan tadı, aromatik kokusu ve düşük biyoyararlanım ile sonuçlanan düşük suda çözünürlük özelliklerinden kaçınmak üzere tercih edilmiştir.

İlk aşamada, Türkiye'den toplanan propolis %96'lık etanol ile üç farklı ekstraksiyon yöntemi ve iki farklı sıcaklık denemesi ile ekstre edilmiştir. Verim, toplam fenol ve flavanoit içerikleri yönünden en iyi ekstraksiyon yöntemi, ultrasonik 30 °C ekstraksiyonu olarak belirlenmiştir. Ekstreye ait, ultraviyole (UV) spektrumu, proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) profili, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizleri gerçekleştirilmiştir. Ardından ultrasonik 30 °C ekstresinin içeriğindeki major bileşen, ince tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisi teknikleri ile izole edilmiş, ¹H-NMR ve sıvı kromatografisi-elektron spray iyonizasyon-kütle spektrometresi (LC-ESI-MS) teknikleri ile galangin olarak tanımlanmıştır. Ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC) yöntemi kullanılarak 1 mg/ml propolis ekstresi içerisinde 0.086 mg/ml galangin olduğu bulunmuş ve UPLC-DAD ile galangine ait UV spektrumu elde edilmiştir.

İkinci aşama olarak ise propolis ekstresi, niozom formülasyonu ile enkapsüle edilmiştir. Niozom formülasyonu eter enjeksiyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Partiküllerin boyutlarını etkileyecek parametreler olarak sonifikasyon süresi, surfaktan oranı ve evaporasyon sıcaklığı seçilmiş, Design Expert programı ile Box Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. ANOVA testi ile modelin anlamlılığının kontrolünün ardından partikül boyutunu minimize edecek optimum değerler %5.61 Tween 80, 41 derece evaporasyon sıcaklığı ve 50 dakika sonifikasyon süresi olarak belirlenmiş, partikül boyutu nanosizer ile 153.6 ± 2.54 nm olarak ölçülmüştür. Yüklenerek etkin madde oranı 1 mg/ml olarak seçilmiştir. Seçilen optimum değerler ve etkin madde miktarı ile üretilen niozomların partikül boyutları 217.2 ± 38.32 nm olarak ölçülmüş, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri sonrası propolis ekstresi ile dolu niozomların, etkin madde içermeyen niozomlara kıyasla birbirine daha yakın, küresellikleri bozulmuş ve tübüler halde oldukları görülmüştür. DSC analizlerine göre ise, propolis ekstresinin niozomlar içerisinde amorf halde olduğu görülmektedir. Propolis ekstresi içindeki galangin miktarı ve yükleme verimi UPLC tekniği ile ölçülmüştür. Galangin temel alınarak, yükleme verimi %64.67 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: propolis, niozom, ekstraksiyon, izolasyon, galangin

ABSTRACT**PRODUCTION OF NIOSOMES LOADED WITH PROPOLIS AS A
POTENTIAL PHARMACEUTICAL AGENT AND THEIR
CHARACTERIZATION**

ULUCAN, Fulden

MSc. in Biotechnology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ozlem YESIL-CELIKTAS

October, 2014, 141 pages

In this study, we aimed encapsulation of propolis as a natural product which has broad spectrum of biological activity in terms of overcoming administration problems and improving bioavailability. Encapsulation is preferred to avoid its strong and unpleasant taste, aromatic odor and low water solubility resulting in low bioavailability.

In the first stage, Turkish propolis was extracted with 96% ethanol by three different techniques at two different temperatures. The best extraction method was chosen in terms of yield, total phenol and flavonoid content as ultrasonic extraction and temperature was chosen as 30 °C. Ultraviolet (UV) spektrum, proton nuclear magnetic resonans (¹H-NMR) profile, differential scanning calorimeter (DSC) of the extract were provided. After that, isolation of the major compound of the propolis ultrasonic 30 °C extract was carried out by prep-TLC and column chromatographies. The isolate was identified by ¹H-NMR and liquid chromatography-electrospray ionization- mass spectrometry (LC-ESI-MS) techniques as galangin. Then, its amount in the propolis extract was determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC) as 0.086 mg galangin/ mg extract and its UV spectrum was obtained by UPLC-DAD.

In the second stage, propolis extract was encapsulated with niosome formulation. Niosome formulation was conducted by ether injection method. A data set including evaporation temperature, sonication time and surfactant ratio which effect particle sizes for encapsulation was created in Design Expert Software. Subsequently, the optimum temperature, sonication time and surfactant ratio were chosen which minimize the particle sizes analyzed by nanosizer. A surfactant ratio of 5.61%, temperature of 41 °C for 50 min was elicited as optimum points yielding a particle size of 153.6 ± 2.54 nm. ANOVA test was carried out and the model was significant. Niosomes were produced in accordance with selected optimum values. Amount of propolis extract was chosen as 1 mg/ml for loading. Particle sizes were measured as 217.2 ± 38.32 nm. Characterization of niosomes was carried out by differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM) analysis. After the SEM analysis, propolis extract loaded niosomes were evaluated as more closer, unspherical and tubular in comparison with non-loaded niosomes. After DSC analysis, propolis extract was an amorph form in niosomes. Loading efficiency and galangin amount in propolis extract were conducted by UPLC in terms of galangin and loading efficiency measured as %64,67.

Key words: niosome, propolis, extraction, isolation, galangin

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince her aşamasında deneyimlerini ve değerli bilgilerini benimle paylaşan danışmanım sayın Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a, her türlü yardımı ve desteğiyle beni kendi öğrencisi olarak benimseyen, sorunlara çözümler bulan manevi danışmanım sayın Doç. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL'e, laboratuvarlarını, ekipmanlarını ve değerli bilgilerini benden esirgemeyen, tezimin sonuçlanmasında büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Erdal BEDİR'e, izolasyon konusundaki tüm deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşan, her türlü soruma cevap veren, bir abi gibi yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. İbrahim HORRO'ya, orada olduğum süre içerisinde yakın ilgilerini ve arkadaşlıklarını gösteren BIONORM LTD. ŞTİ. çalışanlarına, deneylerim esnasında laboratuvarlarını açan ve gerekli teknik desteği sağlayan Ege Üniversitesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL) çalışanlarına, tezimi bünyelerinde yapmamı sağlayan Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne, tezim süresince laboratuvarda birlikte çalıştığım arkadaşlarıma, hayatım boyunca bana her alanda destek olan, güvenen ve inanan aileme, annem Filiz ULUCAN'a ve babam Nusret ULUCAN'a, lisans ve yüksek lisans hayatımda hep yanımda olan, bana moral veren, yardımını esirgemeyen Cemre KULOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xx
TABLolar DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. TAŞIYICI SİSTEMLER	4
2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemleri Tasarlamak İçin Dikkat Edilmesi Gerekenler	4
2.2. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Avantajları	5
2.3. Taşıyıcı Sistemlere Örnekler.....	5
3. ENKAPSÜLASYON.....	6
3.1. Enkapsülasyonun Avantajları	6
3.2. Enkapsülasyonun Özellikleri	6
3.3. Enkapsülasyonun Kullanım Alanları.....	7
3.4. Enkapsülasyon Metotları	7

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>sayfa</u>
4. NİOZOMLAR.....	8
4.1. Niozomun Avantajları.....	10
4.2. Niozomun Dezavantajları.....	10
4.3. Niozomun Kompozisyonu	11
4.3.1. Kolesterol.....	11
4.3.2. Sürfaktanlar	11
4.3.3. Diğer maddeler.....	12
4.4. Niozom Hazırlama Yöntemleri	12
4.4.1. Eter enjeksiyonu.....	12
4.4.2. Etanol enjeksiyonu.....	13
4.4.3. İnce film yöntemi.....	13
4.4.4. Sonikasyon.....	13
4.4.5. Mikro akışkanlaştırma yöntemi	14
4.4.6. Çoklu membran püskürtme yöntemi.....	14
4.4.7. Ters faz evaporasyon tekniği	14
4.4.8. Transmembran pH gradient yöntemi	14

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>sayfa</u>
4.4.9. Bubble yöntemi.....	15
4.4.10. Proniozomdan niozom eldesi.....	15
4.5. Niozomal Formülasyonu Etkileyen Faktörler.....	16
4.5.1. Sürfaktan doğası	16
4.5.2. Sürfaktanın yapısı	19
4.5.3. Membran kompozisyonu	20
4.5.4. Enkapsüle edilecek ilacın özellikleri	20
4.5.5. Sıcaklık	20
4.5.6. Osmotik strese direnç	20
4.5.7. Kolesterol miktarı	21
4.5.8. Yük.....	21
4.6. Niozomun Karakterizasyonu	21
4.6.1. Vezikül çapı ve morfolojisi	21
4.6.2. Vezikül yükü.....	22
4.6.3. Çift tabaka oluşumu	22
4.6.4. Lamel sayısı.....	22

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>sayfa</u>
4.6.5. Membran sağlamlığı ve homojenitesi	22
4.6.6. Yükleme verimi.....	22
4.6.7. In vitro salım	23
4.6.8. Stabilité çalışmaları.....	23
4.7. Niozomun Uygulama Alanları	24
5. PROPOLİS.....	31
5.1. Propolis Kaynakları.....	32
5.2. Propolisin Kimyasal İçeriği.....	34
5.2.1. Propolisin etanol ekstresinde tanımlanan bileşenler	35
5.3. Propolisin Fiziksel Yapısı	38
5.4. Farmakolojik Özellikleri	39
5.4.1. Bilinen farmakolojik etkinlikleri olan propolis bileşenleri	39
5.5. Propolisin İyileştirici Etkileri	41
5.5.1. Antibakteriyel aktivite.....	41
5.5.2. Antifungal aktivite	41
5.5.3. Antiviral aktivite	42

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>sayfa</u>
5.5.4. Antioksidan ve karaciğer koruyucu aktivite	43
5.5.5. Bağışıklık sisteminin gücünü düzenleme etkileri	44
5.5.6. Antitümör etkileri	45
5.5.7. Antiinflamatuar etki.....	45
5.6. Propolis ile Hazırlanan Ürünler	46
6. MATERYAL VE METOT	49
6.1. Materyal.....	49
6.1.1. Kullanılan aletler	49
6.1.2. Kullanılan kimyasal ve doğal maddeler	49
6.2. Metot.....	51
6.2.1. Propolis ekstraksiyonu.....	51
6.2.2. En uygun ekstraksiyon yöntemini belirleme	52
6.2.3. Propolis ekstresinin toplam fenol ve flavanoit tayini	53
6.2.4. Propolisin diferansiyel tarama kalorimetrisi ile analizi	55
6.2.5. Propolisin UV spektrofotometresi ile analizi	55
6.2.6. Propolisin ¹ H-NMR spektrofotometresi ile analizi.....	55

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>sayfa</u>
6.2.7. Propolis içerisindeki major bileşenin izolasyonu	56
6.2.8. İzole edilen bileşenin karakterizasyonu	60
6.2.9. Formülasyon çalışmaları	62
6.2.10. Niozom formülasyonunun karakterizasyonu	65
6.2.11. Yükleme verimi.....	66
7. SONUÇ VE TARTIŞMA	67
7.1. Ekstraksiyon Yöntemlerine Ait Verim Sonuçları	67
7.2. Toplam Fenol ve Flavanoit İçeriği Hesaplama Sonuçları.....	69
7.3. Propolisin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi ile Analizinin Sonuçları (DSC)	71
7.4. Propolisin UV spektrofotometrisi ile Analizinin Sonuçları.....	72
7.5. Propolisin ¹ H-NMR Analizinin Sonuçları	74
7.6. Propolisin İçeriğindeki Major Bileşenin İzolasyonuna ait Sonuçlar	75
7.7. İzole Edilen Bileşenin Karakterizasyonu	81
7.7.1. ¹ H-NMR ve LC-ESI-MS.....	81
7.7.2. UPLC yöntemi	83

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>sayfa</u>
7.8. Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	85
7.8.1. Etkin maddeyi içermeyen niozomlara ait partikül boyutları	85
7.8.2. Anova testi	86
7.8.3. Matematiksel denklem.....	89
7.8.4. Niozom oluşturmak için seçilen formülasyon	90
7.8.5. Partikül boyutu ölçümü.....	91
7.8.6. Seçilen formülasyon ve ilaç miktarı ile üretilen partiküllerin karakterizasyonu	92
7.8.7. Yükleme verimi	95
8. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	96
8.1. Genel Sonuçlar	96
8.2. Öneriler.....	99
KAYNAKLAR DİZİNİ	100
ÖZGEÇMİŞ.....	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1 İlaç Taşıyıcı Sistemleri Oluşturmak İçin 4 Temel Eleman Ve Aralarındaki İlişki (Davis Vd., 1986)	4
2 Niozomların Şematik Gösterimi	8
3 Farklı Tabaka Sayılarına Ve Büyüklüklere Sahip Niozom Partikülleri (Sravanthi B. Den 2014)	9
4 Niozom İçerisinde Sürfaktanın Ve İlacın Konumu (Lembo Vd., 2010).....	10
5 HLB Değerlerine Göre Sürfaktanların Özelliklerini Gösteren Skala	17
6 Sıklıkla Kullanılan Sürfaktanlara Ait HLB Değerleri Atlası (The HLB System, 1976).....	18
7 Arı Kovanından Toplanmadan Önce Propolis	32
8 Ağustos 2013 Tarihinde Sivas, Yıldızeli'nden Toplanmış Propolis.....	50
9 Gallik Asit Standart Eğrisi	54
10 Poliamid Kolon Kromatografisi Deneş Düzenegİ	58
11 RP Kolon Kromatografisi Deneş Düzenegİ	59
12 UPLC Yöntemi ile Elde Edilen Galangin Ait Standart Eğrisi.....	62
13 Kullandığımız Deneş Deseni	64
14 Soldan Sağa Sırasıyla Boş Partikül, 1 mg/ml Propolis Ekstresi Yüklü Partikül, 3mg/ml Propolis Ekstresi Yüklü Partikül, 5 mg/ml Propolis Ekstresi Yüklü Partiküle Ait Görüntü.....	65
15 Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri İçin Verim Sonuçları Ve Grafıksel Gösterimi	68
16 Propolis Ekstresine Ait Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi	71
17 0.05 mg/ml Propolis İçin Elde Edilen Spektrum	72
18 0.03 mg/ml Propolis İçin Elde Edilen Spektrum	72
19 0.02 mg/ml Propolis İçin Elde Edilen Spektrum	73

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
20 Propolis Ekstresine Ait ¹ H-NMR Spektrumu	74
21 Propolis Ekstresine Ait ¹ H-NMR Spektrumu	74
22 95:5 Diklorometan:Metanol Solvent Sisteminde Yürütülen Propolis Ekstresine Ait İTK	75
23 Propolis Ekstresine Ait YP-İTK	76
24 Propolis Ekstresine Ait Prep-İTK	76
25 Prep-İTK Dan Kesilen Bantlar (366 Nm).....	77
26 Prep-İTK Dan Kesilen Bantlar (254 Nm).....	77
27 Prep-İTK Dan Kesilen Bantlar (Asit Muamelesi Sonrası)	78
28 Poliamid Kolondan Toplanan Örneklere Ait İTK Analizi	79
29 RP Kolona Verilen Örnek.....	79
30 RP Kolondan Alınıp Partisyon Yapılan Örnek.....	80
31 İzole Edilen Örneğe Ait ¹ H-NMR Spektrumu (0-8 ppm).....	81
32 İzole Edilen Örneğe Ait ¹ H-NMR Spektrumu (6-8.1 ppm).....	82
33 İzole Edilen Molekülden Pozitif Modda Çekilen LC-ESI-MS Analizi	82
34 Galangin Molekülü	83
35 Propolis Ekstresinin Seçmiş Olduğumuz UPLC Yöntemi İle Analizi	84
36 Galangin Standardına (10 ppm) Ait UPLC Kromatogramı	84
37 Galangine Ait UV Spektrum	85
38 Programın Vermiş Olduğu Formülasyon Değerine Ait Görüntü	90
39 Propolis İçermeyen Niozom Formülasyonuna Ait SEM Görüntüleri A)1000x, B) 5000x, C) 10000x, D) 20000x Büyütme	92
40 Dolu Partiküllere Ait SEM Görüntüleri A) 5000x, B) 10000x, C) 20000x, D) 50000 X Büyütme	93
41 Propolis Ekstresi, Propolis İçeren Ve İçermeyen Niozom Formülasyonuna Ait DSC Analizi.....	94

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1 Literatürdeki niozom uygulamaları.....	25
2 Literatürdeki niozom uygulamaları (devam)	27
3 Literatürdeki niozom uygulamaları (devam)	29
4 Farklı coğrafik bölgelerden ve bitki kaynaklarının propolisi (Toreti vd., 2013)	33
5 Propolis etanol ekstralarında tanımlanan bileşenler	35
6 Bilinen farmakolojik etkinlikleri olan propolis bileşenleri (Toreti vd., 2013)	39
7 Propolisin etkili olduğu patojenik ve zararlı organizmalar (Bogdanov, 2014)	42
8 Ekstraksiyon işleminde uygulanan yöntem, süre ve sıcaklıklar	52
9 Toplam fenol tayini protokolü	53
10 UPLC yöntemine ait hareketli faz sistemi ve zaman çizelgesi	61
11 Deney seti oluşturmak için kullanılan parametrelere ait minimum ve maksimum değerler.....	63
12 Farklı ekstraksiyon metotları için verim sonuçları	67
13 Farklı ekstraksiyon metotlarına ait toplam fenol içeriği sonuçları	69
14 Farklı ekstraksiyon yöntemlerine ait toplam flavanoit içeriği sonuçları	70
15 Deney deseni ile üretilen partiküllerin boyutları (nm).....	85
16 Anova Testinde yer alan parametrelerin birbirleriyle ilişkileri, kareler ortalamaları, f değeri, p değeri	87
17 Tukey' in çoklu karşılaştırma testi.....	88
18 Farklı ilaç yüklemeleri için partikül boyutları ve PDI değerleri.....	91

1. GİRİŞ

Propolis, eski zamanlardan beri aktif olarak kullanılan bir doğal üründür. Kullanımı M.Ö 350 yıllarına kadar dayanmaktadır. Mısırlılar propolisi, çürüme karşıtı etkisinden yararlanarak ölümlerini mumyalamak için kullanmışlardır. Yunan ve Roman hekimler ise antiseptik ve yara iyileşmesini kolaylaştırıcı olarak kullanmışlardır. 17. yüzyılda Londra Farmakopesi'nde propolis resmi bir ilaç olarak yer almıştır (Sforcin vd., 2011). Günümüzde hala popüler bir tedavi olarak kullanılmaktadır. Uçuk tedavisinde (Hoheisel, 2001), genital herpes tedavisinde (Szmeja, 1987) haricen kullanımları bulunmaktadır. Kozmetikte saf formu ya da diğer doğal ürünlerle kombine hali ve ayrıca sağlıklı yiyeceklerin temel yapı taşı olarak yer almaktadır (Sforcin vd., 2011). Propolise ait ticari olarak satılan bir çok ürün de raflarda yerini almaktadır (Kumova vd., 2002).

Propolis toplandığı bölgeye göre kimyasal içeriğinde değişiklik gösteren bir ürün olmasına karşın, polifenoller (flavonoidler, fenolik asitler, esterleri ve aldehitleri, alkoller ve ketonları), terpenoidler, steroidler, amino asitler ve çeşitli inorganik bileşenlerden meydana gelmektedir. Ayrıca bal mumu, yağ asitleri, esansiyel yağlar, polen ve mineralleri de içeriğinde barındırmaktadır (Coneac vd., 2008). Medikal uygulamaları, kimyasal kompozisyonu ile ilgili olduğu kadar orijini ile de ilgilidir. Tedavi edici kullanımında genellikle etanol ekstresi tercih edilmektedir. Yüksek etanol konsantrasyonu, hoş olmayan tadı, kokusu ve katı forma dönüştürme zorluğu gibi dezavantajları nedeniyle uygulamada sorunlar yaşanmakta ve hasta memnuniyeti sağlanamamaktadır (Sahlan, 2013).

Hoş olmayan tat ve kokusunu gidermek, uygulama kolaylıkları yaratmak ve biyoyararlanımını arttırmak üzere enkapsülasyon çalışmalarına gidilmektedir. Enkapsülasyon tekniği, doğal ürünleri olası kayıplardan ve stabilite değişimlerinden korumak için tercih edilmektedir. Biyolojik ürünler, enkapsüle edilerek çevresel ve biyolojik degradasyondan korunmuş olurlar. Ayrıca biyoaktif bileşenlerin biyolojik hedefe ulaşmalarında taşıyıcı sistem görevi görmüş olurlar (Munin vd., 2011).

Taşıyıcı sistemlerin kullanılma fikri yeni değildir. 1800 lü yılların sonlarına doğru Paul Ehrlich, “magic bullet” diye bir kavram ortaya atarak, konakçı organizmaya zarar vermeden hastalığa neden olan organizmayı ya da etkeni seçici olarak etkisiz hale getirebilen sentetik ilaç üretebileceğini belirtmiştir. Ehrlich ilk çalışmasında, frengi hastalığının tedavisinde kullanılan "Salvarsan" (Asfenamin) isimli ilacın bu hastalık etkenine olan seçici etkinliğinden esinlenmiştir ve "sihirli mermi'sini" (Magic bullet) geliştirmeyi başarmıştır. Bu başarısı 1940 yılında çekilen “Dr. Ehrlich’s Magic Bullet” isimli filme konu olmuştur (Bosch vd., 2008).

Taşıma sistemleri amaca ve etkin maddeye göre değişiklik göstermektedir. Etkin maddenin lipofilik ya da hidrofilik karakterine göre taşıyıcı sistem seçmek gerekir. Niozomlar, bütün etkin maddeleri taşımak üzere kullanılabilen, stabilite problemleri olmayan, daha ucuz maliyetli ve uygulama kolaylığı olan taşıma sistemleridir. Lipofilik ilaç taşıma sistemleri olan ve niozomlara nazaran pahalı, stabilite ve saklama sorunları bulunan, lipozomlara alternatif olarak kullanılan sistemlerdir (Vadlamudi vd., 2002).

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızın amacı doğal aktif bir ürün olan propolisin acı tadı ve hoş olmayan kokusu nedeniyle yaşanan uygulama zorluklarının üstesinden gelmek, suda çözünürlüğü çok az olması nedeniyle gelişen düşük biyoyararlanımını arttırmak amacıyla enkapsüle etmek olarak seçilmiştir. Propolisin farklı yöntemler ile ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi, verim ve toplam fenol/flavanoit içeriklerine göre en iyi yöntemin seçilmesi planlanmıştır. Ardından propolis ekstresi içerisindeki major bileşenin çeşitli kromatografik yöntemler ile izolasyonu ve yapı tayininin yapılması hedeflenmiştir. Propolis ekstresinin niozom formülasyonu içerisine hapsedilmesi, bunun için öncelikle niozom partiküllerinin partikül boyutuna etki eden temel parametrelerin seçilmesi, deney tasarımı ile bir deney seti oluşturulması planlanmıştır. Partikül boyutunu minimize eden parametre değerleri istatistiksel olarak yorumlandıktan sonra formülasyonun seçimi ve ardından ekstrenin, belirlenen niozom formülasyonları içerisine hapsedilerek karakterizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar tarandığında, propolis yüklü niozomlarla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca Türkiye’de propolis ile yapılan bir izolasyon çalışması mevcut değildir. Bu anlamda öncü bir çalışma olabileceği düşünülmüştür.

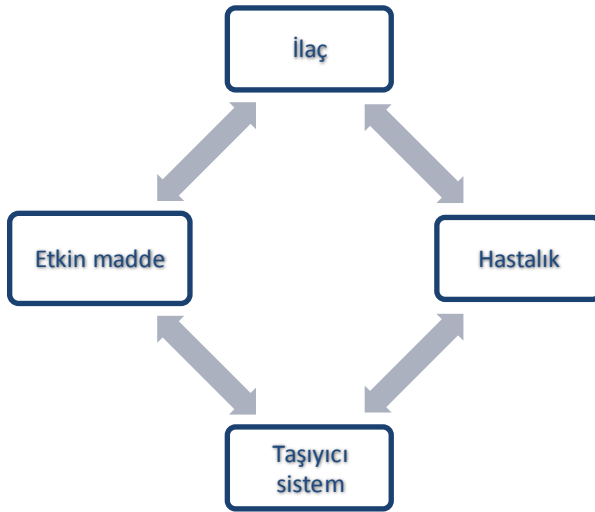
2. TAŞIYICI SİSTEMLER

Vücutta etkin maddenin, istenilen hedef bölgeye gönderilmesi için kullanılan sistemler taşıyıcı sistemler olarak bilinmektedir. İlacın bölgesel olarak hedeflendirilmesi işlemi, etkin maddenin etki veya absorpsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesi olup, hazırlanan taşıma sistemi etkin maddeyi taşıyacak şekilde tasarlanır (Bosch vd., 2008).

2.1.İlaç Taşıyıcı Sistemleri Tasarlamak İçin Dikkat Edilmesi Gerekenler

Yeni sistemlerin tasarımı ve geliştirilmesi sırasında, hedeflendirmenin imkanları ve güçlükleri tartışılmaktadır. Bu konuda 4 temel elemanın aralarındaki ilişkinin tam olarak bilinmesi gerekir (Şekil 1). Bunlar;

- İlaç
- Hedef
- Hastalık
- Taşıyıcı sistemdir (Davis vd., 1986).



Şekil 1: İlaç taşıyıcı sistemleri oluşturmak için 4 temel eleman ve aralarındaki ilişki (Davis vd., 1986)

İlaç taşıyıcı sistemleri oluşturmak için göz önünde bulundurulması gereken bazı parametreler vardır. Bunlar;

- İlacın istenen bölgede toplanabilmesi (seçicilik)
- İlacın yükü
- Etki bölgesinde uygun hızda ilacın salınması
- *In-vitro* stabilite ve *in vivo* olarak istenen bölgeye geçiş
- Minimum toksisite ve maksimum immun yanıt
- Biyolojik olarak parçalanabilirlik
- Hazırlama kolaylığı olarak sayılabilir.

2.2. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Avantajları

Vücutta belli hedeflere ilacın seçici olarak taşınmasının 2 önemli avantajı vardır.

- İlacın, etki bölgesi veya bölgelerinde, istenen hızda etkinliği bakımından en uygun etkileşmeyi sağlamaktadır.
- Etkin maddenin dozunun azaltılması ve etkin maddenin sadece hedef organa dağılımıyla sınırlandırılması mümkün olmaktadır. Böylece oluşabilecek herhangi bir yan etki veya yan etkiler büyük oranda minimuma indirilebilir (Tomlinson vd., 1989).

2.3. Taşıyıcı Sistemlere Örnekler

- Transdermal ve transmukozal kontrollü salınım sistemleri
- Aerosol burun spreylere
- Enkapsüle edilmiş hücreler
- İlaç emdirilmiş pastiller
- Oral soft jeller
- Programlanabilen implante edilebilen ilaç taşıma sistemleri
- Boncuklu taşıma sistemleri verilebilir (Tiwari vd., 2012).

3. ENKAPSÜLASYON

Doğal aktif bileşenleri ya da kimyasal etkin maddeleri olası kayıplardan ve kullanılana kadar stabilitelerinin değişiminden korumak üzere tercih edilen bir yöntemdir. Bileşen, uygun bir kaplama materyali içerisine farklı yöntemler kullanılarak hapsedilebilir.

3.1. Enkapsülasyonun Avantajları

- Enzimatik degradasyona karşı etkin maddenin korunması
- Kullanıcıyı enkapsüle edilen bileşenin yan etkilerinden korunması
- Saatler ve aylar bazında süreçlerde ilacın salım hızının kesin olarak kontrol edilebilmesi
- Kolay uygulama
- Hastanın tedavi ihtiyaçlarına göre ilaç salım profillerinin önceden programlanabilmesi

3.2. Enkapsülasyonun Özellikleri

- İçyapıları, dış kabukları ve matrikslerine göre mikroküreler ya da mikrokapsüller olarak adlandırılırlar.
- Katı, sıvı ya da gaz halde aktif bileşen bulundurabilirler.
- Boyutlarına göre nanopartikül ya da mikropartikül olabilirler.
- Kaplama materyali doğal ya da sentetik polimer ya da yağ olabilir.

3.3. Enkapsülasyonun Kullanım Alanları

- Gıda sektörü
- Veteriner Tıp
- Biyoteknoloji
- Biyomedikal sensörler
- Tarımsal ürünler
- Endüstriyel Kimyasallar
- Kozmetik
- Farmasötik teknoloji

3.4. Enkapsülasyon Metotları

3.4.1. Fiziksel Metotlar

- Püskürtmeli kurutma
- Akışkan yatak kaplama
- Püskürtme-küre haline getirme
- Santrifugal püskürtme
- Süperkritik akışkanlar kullanılan prosesler

3.4.2. Fizikokimyasal Metotlar

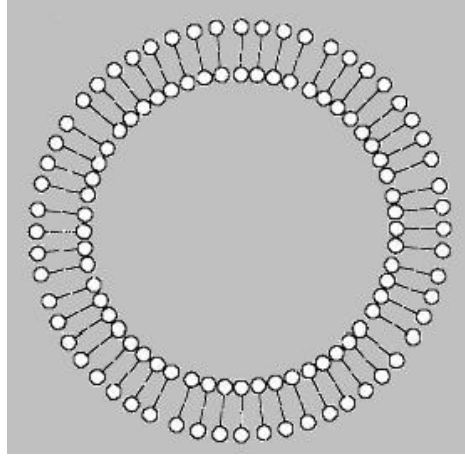
- Püskürterek dondurma
- İyonik jelyasyon
- Solvent evaporasyon-ekstraksiyon
- Basit / kompleks koaservasyon
- Hidrofobik etkileşimler (miseller, lipozomlar, niozomlar)

3.4.3. Kimyasal Metotlar

- Ara yüzey polikondensasyonu
- Ara yüzey polimerizasyonu
- Ara yüzey çapraz bağlama
- In situ polimerizasyon (Munin vd., 2011)

4. NİOZOMLAR

Niozomlar, mikroskopik boyutlarda sentetik non-iyonik surfaktanların hidrasyonu ile elde edilen, kolesterol içeren veya içermeyen veziküllerdir. Lipozomlara benzerler. Amfifilik ve lipofilik ilaçlar için aktif taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomlarda tabakalar fosfolipidlerden meydana gelirken, niozomlardaki tabakalar non-iyonik surfaktanlardan meydana gelmektedir (Şekil 2).



Şekil 2: Niozomların şematik gösterimi

Niozomlar, bir sulu ortam içerisinde non-iyonik surfaktanların kendiliğinden küresel, tek tabakalı, çift tabakalı, çok tabakalı sistemler, kullanılan hazırlama yöntemine göre polihedral yapılar ve susuz çözeltilerin kullanılması ile ters yapılar oluşturması ile meydana gelmektedir (Şekil 3).

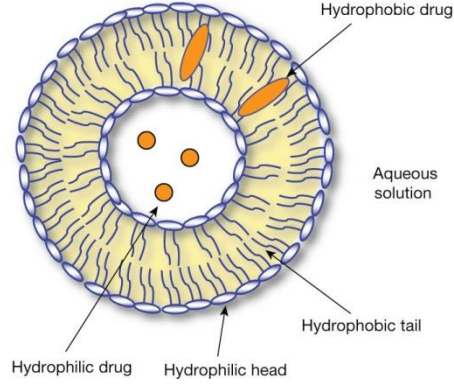
Niozom içerisinde surfaktanın konumu, hidrofilik uçlar dışarı doğru bakarken hidrofobik uçların birbirine doğru bakarak surfaktanın çift tabakasını oluşturacağı şeklindedir (Şekil 4).

Niozomların büyüklükleri 10 ila 1000 nm aralığında değişmektedir. Kolesterol ve az miktarda anyonik surfaktan (örneğin disetil fosfat) eklenmesi non-iyonik surfaktanlar tarafından oluşturulan niozomal vezikülleri stabilize eder.

Niozomlar, surfaktanın ester bağları nedeniyle kolaylıkla hidrolize uğrayabilen fosfolipidlere göre daha yüksek kimyasal stabilitede olmaları ve ucuz olmaları nedeniyle lipozomlardan daha iyi taşıyıcı sistemler olarak önerilmektedirler. Niozomlar ümit verici ilaç taşıma sistemleridir. Niozomal formülasyonların uygulama metodları kas içi, intravenöz, peroral ve transdermal gibi şekillerde çeşitlilik göstermektedir (Vadlamudi vd., 2012).



Şekil 3: Farklı tabaka sayılarına ve büyüklüklere sahip niozom partikülleri (Srvanthi B. den 2014)



Şekil 4: Niozom içerisinde surfaktanın ve ilacın konumu (Lembo vd., 2010)

4.1. Niozomun Avantajları

- Veziküllerin oluşumu çeşitlidir ve kontrol edilebilir,
- Osmotik olarak aktif ve stabildirler,
- Surfaktanların kullanımı ve saklanması için özel koşullar gerekmez,
- Surfaktanlar biyobozunur, biyoyumlu ve immün yanıt oluşturmeyan özelliktedir,
- Ağızdan, deriden ya da paranteral olarak uygulanabilirler,
- Düşük absorbe olan ilaçların oral biyoyararlanımını ve ilaçların deriden penetrasyonunu artırır,
- Daha ucuz bir yöntemdir,
- Çok geniş aralıkta ilacı taşımak için kullanılabilir.

4.2. Niozomun Dezavantajları

- Agregasyon,
- Birleşme,
- Enkapsüle edilen ilacı sızdırması,
- Enkapsüle edilen ilacın hidrolize uğraması (raf ömrünü azaltan etken),
- Boyut küçültebilmek için yüksek enerji ihtiyacı,
- Endüstri seviyesinde üretimlerde fizikokimyasal stabilite problemleri (Madhav vd., 2011)

4.3. Niozomun Kompozisyonu

4.3.1. Kolesterol

Kolesterol, niozomları oluştururken sağamlık, düzgün şekil ve niozomların dizilimini sağlamak amacıyla kullanılır. Veziküllere stabilite sağlamakla görevlidir.

4.3.2. Sürfaktanlar

Sürfaktanlar hidrofilik baş ve hidro fobik kuyruktan oluşurlar.

Sıklıkla kullanılan non-iyonik sürfaktanlar şunlardır:

Spanlar - Span 20, 40, 60, 80 ve 85

Tweenler - Tween 20, 40, 60 ve 80

Brij - Brij 30, 35, 52, 58, 72 ve 76

Eter Bağlı Sürfaktanlar

Bu tip sürfaktanlarda hidrofilik ve hidro fobik kısımlar eter ile bağlıdır.

Örn: polioksi etilen alkil eterleri (C_nE_m)

n- 12 ile 18 arası değişen karbon atomları

m- 3 ile 7 arası değişen polietilen birimleri

Dialkil zincir sürfaktanlar

Moleküler ağrılıkları 972 olan sürfaktanlardır. Sodyum stiboglukonat niozom formülasyonlarında kullanılmaktadır.

Ester bağlı surfaktanlar

Bu tip surfaktanlarda hidrofilik ve hidro fobik kısımlar ester ile bağlıdır.

Sorbitan Esterleri

Sorbitalin parçalı esterlerinin H-C-OH karışımlarıdır.

Polisorbatlar

Polisorbatlar, niozomal hapsedilmiş ilaçların farmakokinetik çalışmalarında kullanılmaktadır (Vadlamudi vd., 2012).

4.3.3. Diğer Maddeler

Yük uyarıcılar sıklıkla niozomlara ilave edilen maddelerdir. Yüzey yük yoğunluğunu arttırarak, veziküllerin agregasyonunu ve birleşmesini engeller. Yük uyarıcı olarak kullanılan negatif ve pozitif olarak yüklenmiş moleküller olduğu rapor edilmiştir. Disetil fosfat (DCP) ve stearyl amin (SA) negatif ya da pozitif olarak yükü uyaran bu tarz membran eklentilerine örnektir (Nasir vd., 2012).

4.4. Niozom Hazırlama Yöntemleri

Seçilen hazırlama yöntemi boyutu, boyut dağılımını, tabaka sayısını, yükleme verimini ve veziküllerin membran geçirgenliğini etkilemektedir. Niozomları oluşturmak için kullanılan hazırlama yöntemleri şunlardır;

4.4.1. Eter enjeksiyonu

Bu yöntemde dietil eter içerisinde çözündürülen surfaktan 40-60 °C aralığında tutulmaktadır. Surfaktanlı eter solüsyonu, 14-gauge şırınga kullanılarak sulu bir çözelti içerisine enjekte edilir. Eterin buharlaşması ile tek tabakalı veziküller meydana gelmektedir. Veziküllerin çapı kullanılan ortam koşullarına bağlı olarak 50-1000 nm aralığında değişir. Bu yöntemin dezavantajı, vezikül

süspansiyonunda sıklıkla bir miktar eterin kalması ve uzaklaştırmanın oldukça zor olmasıdır (Srinivas vd., 2010).

4.4.2. Etanol Enjeksiyonu

Bu yöntem, küçük tek tabakalı veziküllerin sonikasyon kullanılmadan üretilebilmesi için alternatif bir yöntem olarak rapor edilmiştir. Sürfaktanın etanol çözeltisi hızlıca bir iğne yardımı ile tuzlu su ya da diğer bir sulu çözelti ortamına enjekte edilir. Etanolün buharlaşması sonucu veziküller meydana gelir. Enoksasin bu yolla niozomlara hapsedilmiştir (Fang vd., 2001).

4.4.3. İnce Film Yöntemi

Sürfaktan ve kolesterol, dietil eter veya kloroform gibi uçucu bir organik çözücüde çözündürülür. Döner evaporatör kullanarak organik solvent oda sıcaklığında uzaklaştırılırken, katı karışım flaskın çeperlerinde ince bir film olarak kalır. Kurutulan surfaktan filmi, hidrasyon süresince belli bir sıcaklıkta yavaşça karıştırılarak ilacın sulu çözeltisi ile sulandırılır. Bu yöntem ile çok tabakalı niozomlar elde edilir. Isıya duyarlı niozomlar elde etmek için, organik solvent 60 °C'de buharlaştırılır ve flaskın çeperlerinde kalan ince filme oda sıcaklığında ilacın sulu çözeltisi eklenerek çalkalanır. Ardından sonikasyon işlemi uygulanır (Jatav vd., 2011).

4.4.4. Sonikasyon

İlacı içeren tampon çözeltinin bir kısmı 10 ml cam vial içerisindeki surfaktan/kolesterol karışımı içerisine eklenir. Daha sonra karışım niozomları üretebilmek için 3 dakika süre ile 60 °C de titanyum probu sonikatöre konur. Sonikasyon yöntemi genellikle küçük partiküller elde edebilmek için tercih edilir (Baillie vd., 1985).

4.4.5. Mikro Akışkanlaştırma Yöntemi

Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile belli boyut dağılımı, şekilleri ve daha iyi yeniden üretilebilirliği olan tek tabakalı niozomlar elde edilebilmektedir. Yöntemin prensibi, ultra yüksek hızlarda iki akışkanlaştırılmış akımın mikro kanallar içerisindeki etkileşim çemberinde birbiri ile etkileşimine dayanmaktadır. İnce sıvı tabakaların sıkışması, niozom oluşumu alanlarında sağlanan enerjinin aynı kalması ile düzenlenir. Bu da niozomal veziküllerin daha iyi şekillerde, küçük boyutlarda ve daha iyi yeniden üretilebilirlikte olması ile sonuçlanmaktadır (Khandare vd., 1994).

4.4.6. Çoklu Membran Püskürtme Yöntemi

Bu yöntem ile belirlenen boyutta veziküller hazırlanabilir. Bu da polikarbonat membranları 8' e kadar çıkan pasajlama serileri ile yer değiştirerek başarılabilir. Sürfaktan, kolesterol ve disetil fosfat karışımının ince filmi evaporasyon ile elde edilebilir. Daha sonra film, ilacı içeren bir sulu çözelti ile sulandırılır. Çözelti, C16G12 kullanarak polikarbonat membran (0.1µm nükleoporlu) boyunca geçirilir (Suggy vd., 2004).

4.4.7. Ters Faz Evaporasyon Tekniği

Kolesterol ve surfaktan 1:1 oranında alınarak, eter ve kloroform karışımı içerisinde çözündürülür. Bu karışıma sulu ilaç çözeltisi de ilave edilir. İki faz 4-5 °C de sonikasyona uğratılır. Az miktarda fosfat tamponu (PBS) eklenir ve yeniden sonikasyona uğratılır. Organik faz, düşük basınç altında ve 40 °C de uzaklaştırılır. Viskoz niozomal süspansiyon PBS ile seyreltilir ve 10 dakika süre ile 60 °C' lik su banyosunda bekletilerek niozomların oluşması sağlanır (Singh vd., 2011).

4.4.8. Transmembran pH Gradient Yöntemi

Sürfaktan ve kolesterol, yuvarlak tabanlı bir flask içerisinde kloroformda çözündürülür. Solvent evaporasyonu, flaskın çeperlerinde ince bir film oluşturmak üzere düşük basınç altında gerçekleştirilir. Film, 300 ml sitrik asit (pH 4.0) ile

vorteks ile karıştırılarak sulandırılır. Çok tabakalı veziküller elde edilir. Ardından 3 kez dondurulup çözündürülür ve niozomları elde edebilmek için sonikasyona maruz bırakılır. Bu niozomal süspansiyon içerisine sulu ilaç çözeltisi eklenir ve vortekslenir. pH' ı 7.0-7.2 aralığında tutabilmek için PBS kullanılır. Daha sonra karışım niozomları elde edebilmek için 10 dakika süre ile 60 °C' ye ısıtılır (Mayer vd., 1985).

4.4.9. Bubble Yöntemi

Bu yöntem, organik solvent kullanmadan tek basamakta niozomları elde edebilmek için öncül bir yöntemdir. Bubble oluşturma birimi sıcaklığı kontrol edebilmek üzere su banyosu içinde konumlanmış 3 boyunlu yuvarlak tabanlı flask bulundurur. Birinci boyunda su soğutmalı akım, ikinci boyunda termometre ve üçüncü boyunda da nitrojen kaynağı bulunmaktadır. Kolesterol ve surfaktan pH 7.4 olan tampon içerisinde 70 °C' de disperse edilir. Karışım 15 saniye boyunca yüksek gerilim homojenizatörü ile karıştırılır. Ardından hemen 70 °C' de nitrojen gazı köpürtülür (Chauhan vd., 1989).

4.4.10. Proniozomdan Niozom Eldesi

Kaplama materyali olarak sorbitol gibi suda çözünebilir bir taşıyıcı kullanarak ilacın sistemik dolaşımdaki varlığının süresi uzatılabilir. 80 °C' deki su ya da NaCl içeren su ağzı vidalı vial içerisine konur ve proniozomal toz bu vial içerisine doldurulur. Daha sonra vorteksleme ve çalkalama ile 2 dakika süre ile karıştırılır. Niozomal süspansiyon oluşumu gerçekleşmiş olur. Niozomlar, $T > T_m$ sıcaklığında ve sulu çözeltinin eklenmesiyle birlikte karıştırılması ile oluşmaktadır.

T= sıcaklık

T_m =ortalama faz geçiş sıcaklığı

(Blazek vd., 2001)

4.5. Niozomal Formülasyonu Etkileyen Faktörler

- Surfaktan doğası
- Surfaktan yapısı
- Membran kompozisyonu
- Enkapsüle edilecek ilacın özellikleri
- Sıcaklık
- Osmotik strese direnç
- Kolesterol miktarı
- Yük (Vadlamudi vd., 2012)

4.5.1. Surfaktan Doğası

4.5.1.1. Hidrofilik-lipofilik denge

Hidrofilik-lipofilik denge, surfaktanın lipofilik ya da hidrofilik oluşunun belirlenmesi amacıyla molekülün farklı bölgeleri için değerlerin hesaplanması ile yapılan bir ölçümdür. 1949 ve 1954 yıllarında Griffin tarafından tanımlanmıştır. 1957 de Davies tarafından önerilen diğer yöntemler de mevcuttur.

4.5.1.2. Griffin yöntemi

Griffin yöntemi, 1954 yılında non-iyonik surfaktanlar için tanımlanmıştır ve aşağıdaki gibidir.

$$HLB = 20 * M_h/M$$

M_h : molekülün hidrofilik kısmının molekül kütlesi

M: tüm molekülün molekül kütlesi

İşlem sonucunda 0 ila 20 arasında bir değer çıkacaktır. HLB değerinin 0 olması molekülün tamamen lipofilik/hidrofobik bir molekül olduğu, 20 olması ise tamamen hidrofilik/lipofobik bir molekül olduğu anlamına gelmektedir. HLB

değeri, bir molekülün surfaktan özelliklerini tahmin etmek üzere kullanılabilir (Şekil 5);

< 10: yağda çözünebilir (suda çözünemeyen)

> 10: suda çözünebilir (yağda çözünemeyen)

1.5 ila 3: köpürme karşıtı ajan

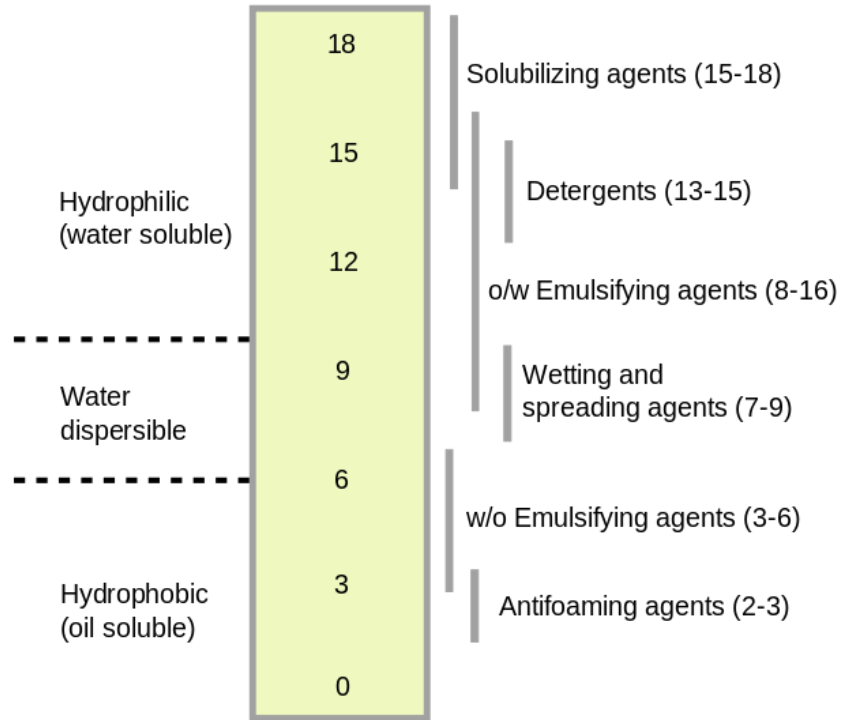
3 ila 6: W/O (yağ içinde su) emülsifiye halde

7 ila 9: ıslatma ve serpmeye ajanı

13 ila 15: deterjan

12 ila 16: O/W (su içinde yağ) emülsifiye halde

15 ila 18: çözüldürücü ya da hidrotop (Griffin, 1954)



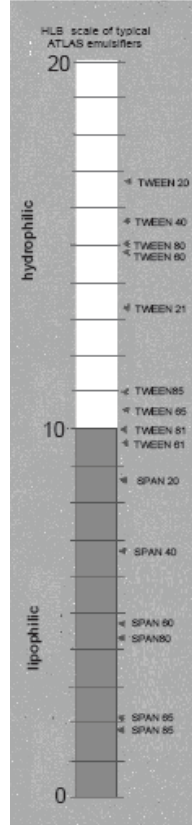
Şekil 5: HLB değerlerine göre surfaktanların özelliklerini gösteren skala

4.5.1.3. Davies'in Yöntemi

1957 yılında, Davies molekülün kimyasal gruplarını temel olarak değer hesaplayan bir yöntem önermiştir. Bu yöntemin avantajı, daha güçlü ve zayıf hidrofilik grupların etkisini hesaba katıyor olmasıdır. Yöntem şu şekilde çalışmaktadır:

$$HLB = 7 + m * H_h - n * H_l$$

- Moleküldeki hidrofilik grupların sayısı
- Hidrofilik grupların değeri
- Moleküldeki lipofilik grupların sayısı
- Lipofilik grupların değeri (Davies,1957)



Şekil 6: Sıklıkla kullanılan surfaktanlara ait HLB değerleri atlası (The HLB System, 1976)

Sıklıkla kullanılan surfaktanlara ait HLB değerleri Şekil 6' da verilmiştir. Surfaktanların HLB değerindeki artış, surfaktan hidrofobikliğindeki artış nedeniyle niozomların serbest yüzey enerjilerindeki düşüşe bağlı olarak ortalama büyüklüklerindeki artış ile sonuçlanır (Yoshida vd., 1992).

HLB değerleri 14 ile 17 arasında değişen surfaktanlar niozomal formülasyonlar için uygun değillerdir. Surfaktanlarda HLB değeri 8.6' lardan 1.7' lere düştüğünde ise yükleme verimliliği düşüşe geçer. En yüksek yükleme verimi HLB değeri 8.6 iken bulunmuştur (Shahiwala vd., 2002).

Niozomların hazırlanması için surfaktanların alkil zincir uzunluğu aralığı C12-C18 uygundur (Ay, 1991).

4.5.2. Surfaktanın Yapısı

Surfaktana ait kritik paketleme parametresi (CPP) vezikülün geometrisini etkilemektedir. Vezikülün geometrisi CPP değerlerine bakılarak tahmin edilebilir.

$CPP < \frac{1}{2}$ ise küresel miseller

$\frac{1}{2} < CPP < 1$ ise çift tabakalı miseller

$CPP > 1$ ise ters miseller

CPP değeri aşağıdaki denklem kullanılarak elde edilebilir.

$$CPP = \frac{V}{l_c \cdot a_o}$$

CPP = kritik paketleme parametreleri

V = hidrofobik grup hacmi

l_c = kritik hidrofobik grup uzunluğu

a_o = hidrofilik baş grubun alanı (Bhaskaran vd., 2002)

4.5.3. Membran Kompozisyonu

İlaça ve surfaktana farklı eklentiler yapılması, niozomları stabil hale getirmek için gerçekleştirilir. Kolesterol eklenmesi membrana sağlamlık kazandırır ve ilacın dışarı sızmasını engeller. Polihedral niozomlara az miktarda solulan C24 (kolesteril poli-24-oksi etilen eter) eklenmesi, sterik engele bağlı gelişen agregasyonları önler (Vadlamudi vd., 2012).

4.5.4. Enkapsüle Edilecek İlacın Özellikleri

Niozomal tabakaların yükü ve sağlamlığı, büyük oranda enkapsüle edilecek ilacın fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir. İlacın hapsedilmesi, surfaktan baş gruplarının etkileşimi ile artan yük sonucu surfaktan çift tabakasının eş itme yaratması ile oluşmaktadır. Böylece veziküllerin büyüklükleri artmaktadır. İlacın HLB değeri, yükleme derecesini etkilemektedir (Stafford vd., 1988).

4.5.5. Sıcaklık

Niozomların büyüklükleri ve şekilleri, hidrasyon sıcaklığından etkilenmektedir. Hidrasyon sıcaklığı jel sıvı faz geçiş sıcaklığının altında olmalıdır. Sıcaklıktaki değişim, surfaktanların veziküller içine dağılımını ve vezikül şekil modifikasyonlarını etkilemektedir. Hidrasyon zamanı ve hidrasyon ortamının hacmi de modifikasyonlar için etkindir. Hidrasyon sıcaklığında, zamanında ve hidrasyon ortamının hacminde yapılacak olan uygun olmayan tercihler, kırılmalı niozomlar elde edilmesi ya da ilaç sızıntı problemleri ile karşılaşılması ile sonuçlanabilir (Rogerson vd., 1988).

4.5.6. Osmotik Strese Direnç

Hipertonik çözeltilerin eklenmesi vezikül çapında azalmaya neden olur. Hipotonik çözeltilerde, veziküllerden gelen sıvının inhibe edilmesi ile birlikte başlangıçta yavaş salım ile başlanırken osmotik stres altında mekanik kayıplara uğrayan vezikül yapılarına bağlı olarak gelişen hızlı salımla devam etmektedir (Vadlamudi vd., 2012).

4.5.7. Kolesterol Miktarı

Kolesterol ile gerçekleştirilen formülasyonlarda yükleme verimi artar ve niozomların hidrodinamik çapları büyür. Kolesterol iki şekilde iş görmektedir;

- Sıvı durum çift tabakalarının zincir sıralarını artırır.
- Jel durum çift tabakalarının zincir sıralarını azaltır.

Kolesterol konsantrasyonundaki artış, çift tabakaların sağlamlığını artırırken enkapsüle edilmiş malzemenin salım hızını azaltır (Hunter vd., 1988).

4.5.8. Yük

Yükün varlığı, çok tabakalı vezikül yapılarında başarılı çift tabakaların lamelları arasındaki uzaklığın artışı ile meydana gelmektedir ve toplam yükleme hacmini arttırmaktadır (Vadlamudi vd., 2012).

4.6. Niozomun Karakterizasyonu

Elde edilen niozom partiküllerinin karakterizasyonu belli parametrelere bağlıdır. Bunlar vezikül çapı ve morfolojisi, vezikül yükü, çift tabaka oluşumu, lamel sayısı, membran sağlamlığı ve homojenitesi, yükleme verimi, *in vitro* salım ve stabilite çalışmalarıdır.

4.6.1. Vezikül Çapı Ve Morfolojisi

Niozomlar küre şeklindedir ve boyutları 20 nm ile 50 µm arasında değişmektedir. Vezikül boyutunu ve boyut dağılımını belirlemek üzere ışık mikroskopisi, kültür sayıcı, foton korelasyon mikroskopisi, atomik kuvvet mikroskopisi, ve donmuş fraksiyon elektron mikroskopisi kullanılabilir. Niozomların şekillerini ve yüzey karakteristiklerini belirlemek için ise taramalı elektron mikroskopi (SEM), atomik kuvvet mikroskopi (AFM) ve sito transmisyon mikroskopi kullanılmaktadır (Abhinav vd., 2011).

4.6.2. Vezikül Yüğü

Vezikül yüzey yüğü, niozomların stabilitesinde ve davranışlarında temel rol oynar. Yüğü niozomlar, yüksüz niozomlara göre agregasyon ve birleşmeye karşı daha kararlıdır. Niozomların yüzey potansiyelleri, mikroeletroforez ya da dinamik ışık saçılması yöntemi ile zeta potansiyel ölçümüne göre belirlenebilir. pH duyarlı florporlar alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirler (Balakrishnan vd., 2009).

4.6.3. Çift Tabaka Oluşumu

Çift tabakalı vezikül oluşumu, ışık polarizasyon mikroskopisi altında non-iyonik surfaktanların dağılımına bağı olarak x-cross oluşumu ile karakterize edilebilir (Manosroi, 2003).

4.6.4. Lamel Sayısı

Veziküllerin içindeki lamel sayısı NMR spektroskopisi, elektron mikroskopisi ve küçük açı X-ray saçılması ile karakterize edilebilir (Kreuter, J.).

4.6.5. Membran Sağlamlığı ve Homojenitesi

Membran sağlamlığı, niozomların biyodağılımı ve biyodegradasyonundan etkilenmektedir. Veziküllerin çift tabaka sağlamlığı, floresan probunun sıcaklığın bir fonksiyonu olarak hareketi ile belirlenebilir. Membran homojenitesi ise P-NMR, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), fourier dönüşüm kızılöte spektroskopisi (FTIR) ve floresans rezonans enerji transferi (FRET) ile belirlenebilir (Muzzalupo vd., 2005).

4.6.6. Yükleme Verimi

Niozomal çözeltinin ilaç yükleme ve enkapsülasyon verimi, yüklenmemiş ilacın ayrılmasından sonra belirlenebilir. Yüklenmemiş ilaç diyaliz, santrifüj ya da jel filtrasyonu yöntemi ile ayrılır.

Yükleme verimi= (enkapsüle edilen ilaç miktarı/toplam ilaç miktarı)*100 formülü ile hesaplanır.

4.6.7. In Vitro Salım

Niozomların *in-vitro* ilaç salımı aşağıdaki yöntemler ile karakterize edilebilir.

4.6.7.1. Diyaliz

Niozomal yüklü ilaçların *in vitro* salım kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılan en basit yöntemdir. Diyaliz membranı kullanılmaktadır. Niozomal süspansiyon, düzgünce kapatılan diyaliz membranı içerisine konulur. Diyaliz işlemi 200 ml tampon çözelti içerisinde düzgün bir karıştırma ile 37 °C' de gerçekleştirilir. Düzenli aralıklarla alınan örneklerden, uygun bir yöntem ile ilaç içerikleri belirlenir.

4.6.7.2. Ters Diyaliz

1 ml dissolüsyon ortamı, içerisine niozomların eklendiği belli sayıda diyaliz tüpü içerisine alınır. Ardından niozomlar dissolüsyon ortamından çıkarılır (Gregoriadis vd., 1993).

4.6.7.3. Franz difüzyon

Niozomlar, Franz difüzyon hücresi içinde oda sıcaklığında uygun dissolüsyon ortamına karşı bir selofan membran boyunca diyaliz edilirler. Günümüzde, niozomlardan enkapsüle edilen maddenin görüntülenmesinde FRET yöntemi kullanılmaktadır (Muller vd., 2002).

4.6.8. Stabilite Çalışmaları

Niozomların stabilitesi surfaktan ve kolesterolün tipi ve konsantrasyonundan etkilenmektedir. Stabilite, sabit partikül boyutu ve sabit tutulmuş ilaç miktarı ile belirtilmektedir. Ör: sonikasyona uğratılmış küresel

niozomlar oda sıcaklığında stabildir. Sonikasyona uğratılmış polihedral niozomlar ise oda sıcaklığında stabil değilken, faz geçiş sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda stabildirler (Arunothayanun vd., 2000).

4.7. Niozomun Uygulama Alanları

- İlaç Taşıyıcı Sistemler
- İlaç Hedefleme Çalışmaları
- Anti-neoplastik tedavi
- Leishmaniasis
- Peptid ilaçların taşınması
- Hemoglobin taşıyıcısı
- Kanser tedavisi
- Dermal hastalıkların tedavisi
- Sürdürülebilir salım
- Bölgesel ilaç etkileri (Sonia vd., 2012)
- Tanısal görüntüleme (Luciani vd., 2004)
- Aşı adjuvanı (Vangala vd., 2006)

Literatürdeki Niozom Uygulamaları

Yapılan literatür taramasında elde edilen niozom uygulamaları örnekleri Tablo 1-3' te verilmiştir. Çalışmaların 1985' lerden günümüze ulaştığı görülmektedir.

Tablo 1. Literatürdeki niozom uygulamaları

İL AÇ	KATEGORİ	ÇALIŞMANIN SAHİBİ VE YILI
Metotreksat	Psoriasis	Azmin <i>vd.</i> -1985 Chandraprakash <i>vd.</i> - 1992,1993 Udupa <i>vd.</i> - 1993 Lakshmi <i>vd.</i> -2007
5, 6- karboksi floresans	Teşhis ajanı	Baillie <i>vd.</i> -1985
Sodyum stiboglukonat	Anti- leishmaniasis	Baillie <i>vd.</i> -1986 Carter <i>vd.</i> -1989
Adriamisin	Anti-kanser	Rogerson <i>vd.</i> - 1987
Doxorubisin	Anti-kanser	Rogerson - 1988 Cable -1989 Uchegbu <i>vd.</i> -1995
Antimoni	Anti- leishmaniasis	Hunter <i>vd.</i> -1988
Hemoglobin	Oksijen taşıyıcı	Moser <i>vd.</i> -1989
9-desglisinamid, 8- arginin	Peptides	Yoshida <i>vd.</i> -1992

Bovin serum albumin	Protein	Brewer and Alexander-1992
Flurbiprofen, Piroksikam	Anti-inflamatuur	Reddy <i>vd.</i> -1993
Vinkristin sülfat	Anti-kanser	Parthasarathi <i>vd.</i> -1994
Diklofenak	Anti-inflamatuur	Raja naresh <i>vd.</i> -1994
Estradiol	Hormon	Hofland <i>vd.</i> -1994 Don <i>vd.</i> -1997
Rifampisin	Anti-tüberkülar	Jain <i>vd.</i> -1995,2006 Mullaicharam <i>vd.</i> -2004 Jatav <i>vd.</i> -2011

Tablo 2. Literatürdeki niozom uygulamaları (devam)

İLAC	KATEGORİ	ÇALIŞMANIN SAHİBİ VE YILI
Eritromisin	Anti-bakteriyal Oftalmik	Jayaraman <i>vd.</i> -1996 Vyas jigar <i>vd.</i> -2011 Perini <i>vd.</i> -1996
Bleomisin	Anti-kanser	Naresh <i>vd.</i> -1996
Siprofeoksasin, norfeoksasin	Anti-bakteriyal	Souza DS <i>vd.</i> -1997
Withaferin A	Anti-tümör	Sheena <i>vd.</i> -1998
Timolol maleat	Anti- hipertansiyon	Vyas SP <i>vd.</i> -1998
Indometazin	Anti-inflamatuar	Namdeo <i>vd.</i> -1999
Lutein üreten hormon	Hormon	Arunothayanam <i>vd.</i> -1999
Sumatriptan suksinat	Migren tedavisi	Gayatri DS <i>vd.</i> -2000
Sitarabin hidroklorid	Anti-kanser	Ruckmani <i>vd.</i> - 2000
Pentoksifilin	Anti-parkinson	Japtap And Inamdar-2001
Dithranol	Anti-psotiatic	Agarwal <i>vd.</i> -2001
Enoksasin	Anti-bakteriyal	Fang <i>vd.</i> -2001
Tretoin	Anti-akne	Manconi <i>vd.</i> -2002
Kolşisin	Mutajen	Hao <i>vd.</i> -2002
Lidoksin	Anestezik	Carafa <i>vd.</i> -2002
Trans retinoik asid	Anti-akne	Desai <i>vd.</i> -2002

Nimesulid	Anti-inflamatuar	Shahiwala <i>vd.</i> -2002
Ketokonazol	Anti-fungal	Satturwar <i>vd.</i> -2002 Arora <i>vd.</i> 2010
Daunorubisin hidroklorid	Anti-kanser	Balasubramanian <i>vd.</i> -2002
Tretoin II	Anti-akne	Manconi <i>vd.</i> -2003
PEGlenmiş paramagnet	Teşhis ajanı	Luciana <i>vd.</i> -2004
Vazo aktif peptid	Peptid	Dufes <i>vd.</i> -2004
Asetazolamid	Diüretik	Aggarwal <i>vd.</i> -2004 Guinedi <i>etal</i> -2005 Khandare <i>vd.</i> - 2005 Aggarwal <i>vd.</i> -2007

Tablo 3.Literatürdeki niozom uygulamaları (devam)

İL AÇ	KATEGORİ	ÇALIŞMANIN SAHİBİ VE YILI
Primakin	Anti- malarial	Varghese <i>vd.</i> -2004
Bolaform		Muzzalupo <i>vd.</i> -2005
Timolol maleate	Anti- midriatik	Aggarwal <i>vd.</i> -2005
β-karoten	Vitamin	Palozza <i>vd.</i> -2006
Finesterid	Erkek tipi kelliği tedavi	Tabbakhian <i>vd.</i> -2006
Piroksikam	Anti- inflamatuvar	Nidhi <i>vd.</i> -2006
Insulin	Hormon, anti-diabetik	Paradakhty <i>vd.</i> -2007
Tretoion III	Anti-akne	Manconi <i>vd.</i> -2006
Verapamil	Anti-anginal	Varshney <i>vd.</i> -2007
Flurbiprofen	Anti- inflamatuvar	Mokhtar <i>vd.</i> -2008
Isoniazid	Anti-tüberkular	Roopa <i>vd.</i> -2008 Gyanendra <i>vd.</i> -2011
Kromolin sodyum	Anti-astimatik	Elbary <i>vd.</i> -2008
Minoksidil	Alopecia tedavisi	Prabagar <i>vd.</i> -2009
Flukonazol	Anti- fungal	Kumar sharma <i>vd.</i> -2009
Glikazid	Anti-diabetik	Tamizharsi <i>vd.</i> -2009
Griseofulvin	Anti- fungal	Pratap <i>vd.</i> -2009
Salbutamol sülfat	Anti-astimatik	Bhaskaran <i>vd.</i> -2010
Terbinafin hidroklorid	Anti- fungal	Sathali <i>vd.</i> -2010

Gatifloksasin, rifampisin	Anti-biyotik	Pavala rani <i>vd.</i> -2010
Aseklufenak	Anti-inflamatuar	Srinivas <i>vd.</i> -2010 Solanki <i>vd.</i> -2010
Ofloksasin	Anti-bakteriyal	Naveen <i>vd.</i> -2010
Brimonidin tartrat	Anti-glukomatik	Prabhu <i>vd.</i> - 2010
Salmeterol xinafoat	Anti-astimatik	Mouzam <i>vd.</i> -2011
Venlafeksin	Anti-depresan	Negi <i>vd.</i> -2011
Mikonazol	Anti-fungal	Mohamed <i>vd.</i> -2011
Sefpodoksim proksetil	Antibiyotik	Sambathkumar <i>vd.</i> -2011
Asiklovir	Anti-viral	Kapoor <i>vd.</i> -2011
Üre	Anti-psoriatic	Lakshmi <i>vd.</i> -2011
Sefuroksim aksetil	Antibiyotik	Sambhakar <i>vd.</i> -2011
Rofekoksib	Anti-inflamatuar	Das <i>vd.</i> -2011

4.6.10. Ticari Niozom Uygulamaları

Ticari olarak satılan niozomal kozmetik ürünleri şunlardır;

- Estee Lauder - Beyond Paradise After Shave Losyon
- White Shoulders Eau De Cologne Spray,
- Orlane Lip Gloss,
- Le Classique Eau De Toilette Spray,
- Love In Paris- Deodorant Spray,
- Liz Claiborne - Realities Duş Jeli,
- Givenchy - Blanc Parfait – Günlük Bakım Kremi,
- Lancome- Foundation & Complexion,
- Britney Spears- Curious Coffret,

- Elene - Eye Care, Guinot – Gece Bakım Kremi,
- Gatineau - Moderactive – Cleanser,
- Shiseido - Bio Performance – Gece Bakım Kremi,
- Boss Soul After Shave,
- Amarige Eau De Toilette Spray,
- Chrome Eau De Toilette Spray,
- Golden Beauty After Sun Soothing Nemlendirici,
- Guinot – Cleanser Gentle Face Exfoliating Cream

(Vadlamudi vd., 2012).

5. PROPOLİS

Propolis, arılardan ve ağaçların tomurcuklarından salgılanan, arı enzimleri ve balmumu ile karıştırılan reçineli bir maddedir (Şekil 7). Propolis kelimesi anlam olarak Yunanca pro=ilk ya da savunma ve polis=şehir anlamına gelmektedir.

Arılar, propolisi iç duvarları pürüzsüzleştirerek koloniyi hastalıklardan korumak ve kovuğa izinsiz giren diğer canlılara ait ölümlerin parçalanmasını engellemek üzere kullanırlar (Bankova vd., 2000). Batı balarısı (Avrupa balarısı) türü *Apis mellifera* kolonileri tarafından toplanılan propolis, Asya balarısı türleri tarafından toplanılmamaktadır. Meliponine (iğnesiz) cinsi arılarda kovanlarının kapatılmasında, bal ve polen gözlerinin yapımında *Apis mellifera*'ya benzer yapıda yapışkan reçineli bir madde toplamaktadır (Kumova vd., 2002).



Şekil 7: Arı kovanından toplanmadan önce propolis

5.1. Propolis Kaynakları

Propolisin yoğun olarak toplandığı bitki çeşitleri bölgeye ve mevsime göre değişiklik gösterir. Bal arıları için; *Pinus spp* (Çam) reçineleri, *Betula spp* (Hus), *Populus spp* (Kavak ve türleri), *Aesculus hippocastanum* (At kestanesi), *Salix spp* (Söğüt), *Alnus spp* (Kızıl Ağaç), *Abies spp* (Kökner), *Prunus spp* (Erik), *Ulmus spp* (Kara Ağaç), *Quercus spp* (Meşe), *Fraxinus excelsior* (Dişbudak) bitkileri önemli propolis kaynaklarıdır. Avrupa ülkelerinde; kavak türleri genelde birinci derece; meşe, söğüt ve huş ikinci derecede propolis kaynağı olan bitkilerdir. Avustralya'da okalıptüs, İtalya'da kestane, Orta Rusya'da huş, Amerika Birleşik Devletlerinde kavak ve çam türleri, Hindistan'da kavak türleri önemli propolis kaynaklarıdır (Bankova, 2005).

Propolisin kimyasal yapısı ile ilgili ilk çalışmalar 1970 yıllarında kavak ve huş ağacı tomurcuk salgılarının karşılaştırılması üzerine yapılmıştır. Ardından birçok çalışma gerçekleştirilmiş ve sıcak iklimli bölgelerde kavak türleri ve kavak hibritlerinin tomurcuk salgılarının propolisin asıl kaynağı olduğu kimyasal olarak kabul edilmiştir. Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın tropik olmayan bölgelerinde ve Yeni Zelanda'da kavak türleri propolis için kaynak bitki olarak gösterilmiştir. Rusya'da özellikle kuzey bölgelerde huş ağacı (*Betula verrucosa*) değerli bir propolis kaynağıdır. Tropikal bölgelerde ise huş ve kavak ağacının bulunmaması, arıları propolis için yeni kaynaklara yönlendirmiştir. Tropik iklim bölgelerinde propolisin bitkisel kaynağı olarak Tunus'ta *Cistus spp.*'nin yaprak salgıları,

Sonoran çölünde *Ambrosia deltoidea* bitkisi olarak göze çarpmaktadır. Venezuela'dan elde edilen propolis örneklerinden polyprenylated benzophenones'i izole edilmiştir ve bu bileşikler bazı *Clusia* türlerinin çiçeklerinin resin salgılarının asıl bileşenleridir. Araştırmacılar ilgili bölgede *Clusia major* ve *Clusia minor* bitkilerinin propolisin asıl kaynağı olduğunu göstermişlerdir. Avustralya'da *Xanthorrhoea spp.* ve Brezilya'da *Baccharis spp.* türlerinin propolis kaynağı olabileceği üzerinde durulan çalışmalar yapılmıştır (Toreti vd., 2013) Tablo 4' de farklı coğrafi bölgelerin ve bitki kaynaklarının propolisleri gösterilmektedir.

Tablo 4. Farklı coğrafi bölgelerden ve bitki kaynaklarının propolisi (Toreti vd., 2013)

Coğrafi bölge	Bitki kaynağı
Bulgaristan	<i>Populus nigra</i> , <i>P. Italic</i>
Arnavutluk	<i>Populus nigra</i>
Bulgaristan	<i>Populus tremula</i>
Moğolistan	<i>Populus suaveolens</i>
ABD (anakara)	<i>Populus fremontii</i>
ABD (Hawai adaları)	<i>Plumeria acuminata</i> , <i>Plumeria acutifolia</i>
Birleşik krallık	<i>Populus euramericana</i>
Macaristan	<i>Betula</i> , <i>Populus</i> , <i>Pinus</i> , <i>Prunus</i> , <i>Acacia spp.</i> ; <i>Aesculus hypocastane</i>
Polonya	<i>Betula</i> , <i>Alnus spp.</i>
Ekvatoryal Bölgeler	<i>Delchampia spp.</i>
Ekvatoryal Bölgeler	<i>Clusia spp.</i>
Avustralya	<i>Xanthorrhoea</i>
Kuzey sıcaklık bölgesi	Kavak, huş, karaağaç, akçaağaç, kayın, kozalaklı ağaç ve at kestanesi
Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın tropik olmayan bölgeleri (poplar propolis)	Aigeiros bölgesinden <i>Populus spp.</i> , sıklıkla <i>P. nigra L.</i>

Rusya (Huş propolis)	<i>Betula verrucosa Ehrh.</i>
Brezilya(yeşil-alecrim propolis)	<i>Baccharis spp. Predominantly B. dracunculifolia DC.</i>
Küba, Venezüella	<i>Clusia minor</i> <i>Clusia spp.</i>
Güney Brezilya (tip 3), Arjantin ve Uruguay	<i>Populus alba</i>
Brezilya (Kuzeydoğu Brezilyadan tip 6 propolis)	<i>Hyptis divaricate</i>
Brezilya (Kuzeydoğu Brezilyadan tip 13 propolis)	<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>

Propolis kaynaklarının bilinmesi, arı yetiştiricilerinin arıların uçuş alanında yoğun olarak bulunan bitkileri bilmeleri açısından önem taşımaktadır. Arılar çevreden propolis toplayamadıkları zaman çeşitli boya, asfalt ve mineral yağları içeren maddeleri propolis gibi kullanmak amacıyla toplamak zorunda kalırlar. Bu durumda propolisin farmakolojik etkisi tehdit altına girmektedir.

5.2. Propolisin Kimyasal İçeriği

Propolisin temel bileşenleri reçineler (benzoik ve sinamik asit türevleri ve flavanoitler), balmumu ve yağ asitleri, temel yağlar, polen ve minerallerdir. Propolis, yaklaşık olarak %50 reçine ve zamksı maddeler, %30 bitkisel mumlar, %10 esansiyel yağlar, %5 polen ve %5 organik bileşikler ve minerallerden meydana gelmektedir (Thomson, 1990).

Propolisin kimyasal içeriği kalitatif ve kantitatif olarak botanik kökenine ve bölgesel bitki ekolojisine göre değişiklik göstermektedir (Nolkemper vd., 2010). Ayrıca mevsime, ışıklandırmaya, toplama tipine, besin bulunabilirliğine ve arıların oyuğunun çevresindeki bitki tiplerine göre de değişmektedir (Toreti vd., 2013).

Propolisi kimyasal bileşiklerine ayırmak oldukça güçtür. Ancak son yıllarda yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometresi ve gaz kromatografisi (MS-GC) teknikleri kullanılarak propolis içerisinde çok az miktarda bulunan ve organik çözücülerde çözünen 149 bileşik ve 20 iz element tespit edilmiştir (Kutluca vd., 2008). Bazı çalışmalarda propolisin esterler gibi fenolik benzeri bileşikler, farklı türlerde flavanoitler, yağ asitleri, terpenler, steroidler, aminoasitler, polisakkaritler, hidrokarbonlar ve alkol içerdiği söylenmektedir (Lopes vd., 2013).

Kullanılan çözücü ve ekstraksiyon yöntemi, propolis ekstresinin kimyasal içeriğini değiştirir. Ticari olarak satılan tabletler, kapsüller, ampuller ve şuruplar propolisin etanol ekstresi ile hazırlanmaktadır. Metanol ise sadece araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır.

5.2.1. Propolisin Etanol Ekstresinde Tanımlanan Bileşenler

Farklı bölgelerden toplanan propolisin etanol ekstralarında farklı bileşenler tanımlanmıştır. Tablo 5’ te bu tanımlanan bileşenler gösterilmektedir.

Tablo 5: Propolis etanol ekstralarında tanımlanan bileşenler

Örnek	Tanımlanan Bileşen
Bulgar propolisi	3,7-Dihidroksi-5-metoksiflavanon 2,5-dihidroksi-7-metoksiflavanon
Kuzey ve Güney Bulgaristan	Dihidrokafeik asit Dihidroferulik asit Dihidroksiasetofenon hidroksimetoksiasetofenon β -Fenetil alkol Benzil alkol pinobanksin

	<p>Pinostrobin</p> <p>Dimetil kaempferol</p>
Brezilya/Sao Paulo bölgesi	3-Pirenil-4-dihidro sinamoyl asit
Brezilya/Sao Paulo bölgesi- Botukatu şehri	9-E ve 9-Z 2,2-Dimetil-6-karboksietenil-8-prenil-2H-benzopiran
Brezilya/Sao Paulo bölgesi	<p>Dehidroabietik asit</p> <p>Abietik asit</p> <p>β-Amirin</p> <p>Amirin Triterpenik alkolü 9(11) çift bağı ile Lanosterol izomeri</p>
Belirtilmemiş	<p>(E)-2,3-Dihidrokoniferil p-kumarat</p> <p>(E)-3-(2,3-Dihidro-2-[2-[(E)-psoumaroiloksi]-1-metiletil]-5-benzofuranil)-2-propenoik asit</p> <p>(E)-4-(2,3-Dihidro sinamoyloksi) sinamik asit</p> <p>(E)-3-(2,2-Dimetil-3,4-dihidro-3-hidroksi-2H-1-benzopiran-6-il)-2-propenoik asit</p> <p>(E)-3-[2,3-Dihidro-2-(1-metiletlenil)-5-benzofuranil]-2-propenoik asit</p> <p>(E)-3-[2,3-Dihidro-2-(1-metiletlenil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenoik asit</p> <p>(E)-3-3-[(E)-4-(2,3-Dihidro sinamoyloksi)-3-metil-2-butenil]-4-hidroksi-5-prenilfenil-2-propenoik asit</p> <p>Dihidro kemferol (aromadendrin)</p> <p>6-Metoksikemferol</p> <p>4-Hidroksi-3-prenilbenzoik asit</p>

	Plikatin B Kapillartemis in A
Japonya/Okinawa	Prokinawan
Brezilya propolis tipi 6	Hiperibon A
Meksika/Champaton	1-(3,4.-Dihidroksi-2-metoksifenil)-3-(fenil)propan (z)-1-(2-Metoksi-4,5-dihidroksifenil)-2-(3-fenil)propen 3-Hidroksi-5,6-dimetoksiflavan (-)-7-Hidroksiflavanon (-)-Mukronulatol (-)-Arizonikanol a (+)-Vestitol (-)-Melilotokarpan a (-)-Melilotokarpan d (+)-Pinokembrin
Yunanistan (altı bölge)	18-Hidroksiabieta-8, 11,13-trien Dihidroksiabieta-8,11,13-trien; hidroksidehidroabietik asit 18-Süksiniloksiabietadien 18-Süksiniloksiabietadien (izomer) 18-Süksiniloksihidroksiabietatrien
Kenya propolisi	Tetrahydrojustisidin B 6-Metoksifillin Fillamirisin C Makarangin

	Schweinfurthin A Schweinfurthin B
Endonezya/Doğu Java /Batu şehri	5-Pentadesilresorkinol 5-(8'z, 11'z Heptadesadienil)-resorkional 5-(11'z-Heptadesenil)-resorkinol 5-Heptadesilresorkinol Propolin d Propolin c Propolin f Propolin g
Ürdün propolisi	24(z)-1 β -3 β -Dihidroksieupha-7,24-dien-26-oik asit
Honduras	(E, Z)-Sinnamil sinnamat
Solomon adaları	Solofenol (A)

5.3. Propolisin Fiziksel Yapısı

Propolis 25-45 °C arasında mum kıvamında elastik bir yapı göstermekte, soğukta katı kırılğan bir şekle dönüşmektedir. Genellikle 60-70 °C' de kısmen erimekte fakat bazı örneklerin erime sıcaklığı 100° C' lere kadar çıkmaktadır.

Propolisin rengi bitki kaynağına bağlı olarak sarı, yeşil ve koyu kahverengine kadar değişim gösterebilir. Propolis eter, kloroform, glikol, aseton ve diğer organik çözücülerde kısmen, %95'lik alkolde büyük ölçüde erimekte, suda çok az veya hiç erime göstermemektedir. Propolis, tıbbi alanda %70'lik alkolde erimiş çözelti olarak kullanılır (Krell, 1996).

5.4. Farmakolojik Özellikleri

Propolis içeriğindeki bileşenler farklı farmakolojik etkinliklere sahiptir. Ana gruplardan flavanoitler, propolisin antibakteriyel aktivitesinden temel olarak sorumludur. Ayrıca antikanserojen ve bağışıklık düzenleyici etkisinden de sorumludur (Coneac vd., 2008).

5.4.1. Bilinen Farmakolojik Etkinlikleri Olan Propolis Bileşenleri

Propolis içeriğindeki bileşenlerin her birinin farklı farmakolojik etkinlikleri olabilmektedir. Tablo 6’ da bilinen farmakolojik etkinlikleri olan propolis bileşenleri verilmiştir.

Tablo 6. Bilinen farmakolojik etkinlikleri olan propolis bileşenleri (Toreti vd., 2013)

Kimyasal Bileşen	Etkinlikleri
Asasetin	Anti inflamatuvar
Apigenin	Anti inflamatuvar
Artepillin C	Anti mikrobiyal Anti tümör etkinlik Anti oksidatif
Kafeik asit ve fenetil ester (CAPE)	Anti tümör etkinlik Anti inflamatuvar
Krisin	Anti inflamatuvar
Kafeik asit	Anti bakteriyel

	Anti fungal Anti viral Anti inflamatuvar
Sinnamik asit	Anti inflamatuvar
Dikafeoilkuinik asit türevleri	Karaciğer Koruyucu
Ferulik asit	Anti inflamatuvar
Galangin	Anti inflamatuvar
Gallik asit	Anti inflamatuvar
Moronik asit	Anti HIV
İzoferulik asit	Anti inflamatuvar
Pinostrobin	Lokal anestezi
Protokatekuik asit	Anti inflamatuvar
Pinosembrin	Anti bakteriyel Anti fungal Küf giderici Lokal anestezi
Propofol	Anti oksidatif
ρ -Koumarik asit	Anti bakteriyel
m-Koumarik asit	Anti inflamatuvar

o-Koumarik asit	Anti inflamatuvar
Kuersetin	Anti inflamatuvar Anti viral Anti histamin Ülser iyileştirici Kılcal damar güçlendirici
Uçucu Bileşenler (fenoller, esterler, terpenoik asit vb.)	Anti bakteriyel
2,2-Dimetil-6-karboksietil-2H-1-benzopiran	Anti mikrobiyal
3-[3,4-Dihidroksi-5-prenilfenil]-2-(E)-propenoik asit	Anti oksidatif

5.5. Propolisin İyileştirici Etkileri

5.5.1. Antibakteriyel Aktivite

Propolisin antibakteriyel etkisi bakteriyosidal şekildedir. Yani, hareketlerini engelleyerek bakterilerin ölmesini sağlamaktadır. Her propolis tipi farklı antibakteriyel içerik barındırmaktadır (Bogdanov, 2014).

Apis mellifera caucasica tarafından toplanan kavak propolisi, *Apis mellifera anatolica* ve *Apis mellifera carnica* tarafından toplanan propolisten daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Silici vd., 2005).

Propolis etanol ekstresi yaklaşık altı ay boyunca antimikrobiyal etkisini korumaktadır (Silva, 2009).

5.5.2. Antifungal Aktivite

Kavak propolisi en yüksek antifungal aktiviteye sahip olan propolis tipidir. Türkiye’de *Apis mellifera caucasica* tarafından toplanan kavak propolisi, *Apis*

mellifera anatolica ve *Apis mellifera carnica* tarafından toplanan propolisten daha yüksek antifungal aktiviteye sahiptir (Silici vd., 2005).

5.5.3. Antiviral Aktivite

Propolis virüslerin ve fungusların büyümelerini engellediği gibi aynı zamanda öldürmektedir (Marcucci, 1995). Propolisin virüsler üzerindeki en dikkate değer etkisi influenza virüse karşıdır (Kujumgiev vd., 1999).

5.5.3.1. Propolisin Etkili olduğu Patojenik ve Zararlı Organizmalar

Tablo 7’ de propolisin etkili olduğu patojenik ve zararlı organizmaların listesi verilmiştir (Bogdanov, 2014).

Tablo 7. Propolisin Etkili olduğu Patojenik ve Zararlı Organizmalar (Bogdanov, 2014)

Gram Pozitif Bakteriler
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus mesentericus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Mycobacteria sp.</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <u><i>Streptococcus</i></u> : <i>critecus epidermis faecalis mutans</i> , <i>pyogenes</i> , <i>viridans</i> , <i>sobrinus</i> ,
Gram Negatif Bakteriler
<i>Branhamella catarrhalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Klebsiella ozaemae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <u><i>Salmonella</i></u> : <i>choleraesuis</i> , <i>dublin</i> , <i>enteritidis</i> , <i>exneri</i> , <i>gallinarum</i> , <i>pullorum</i> , <i>paratyphi-A</i> , <i>paratyphi-B</i> , <i>typhi</i> ; <i>Shigella</i> : <i>dysinteriae</i> , <i>sonnei</i>
Fungi
<i>Aspergillus sp.</i> , <u><i>Candida</i></u> : <i>albicans</i> , <i>guiliermondi</i> , <i>parapsilosis</i> , <i>tropicalis</i> ; <i>Cryptococcus sp.</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma encapsulatum</i> , <i>Madurella mycetomi</i> , <u><i>Microsporium</i></u> : <i>audouinii</i> , <i>canis</i> , <i>cepleo</i> , <i>distortum</i> , <i>ferrugineum</i> , <i>gypseum</i> ; <i>Piedra hortae</i> , <i>Phialophora jeanselmei</i> , <i>Saccharomyces sp.</i> , <u><i>Trichophyton</i></u> : <i>sp.</i> , <i>mentagrophytes</i> , <i>rubrum</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i>

Virüsler
<i>Adenovirus, Coronavirus, Herpes symplex, Influenca A and B virus, Newcastle disease virus, Polio virus, Vaccinia, Rotavirus; Vesicular Stomatitis Virus, Coronar virus</i>
Parazitler
<i>Cholomonas paramecium, <u>Eimeria</u>: magna, media, perforans;</i> <i>Giardia lambia, Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma evansi</i>

5.5.4. Antioksidan ve Karaciğer Koruyucu Aktivite

5.5.4.1. Antidoksidan Aktivite

Propolisin antioksidan aktivitesi, toplam polifenol konsantrasyonu ile ilişkilidir. Kavak propolisi, Brezilya propolisinden göreceli olarak daha fazla polifenol içerir ve bu nedenle daha yüksek antioksidan aktivite gösterir (Kumazawa vd., 2004).

Antioksidan aktivite polifenollerin tipine göre de farklılık gösterir. Kavak propolisinin tipik bileşeni olan CAPE (kafeik asit fenetil ester), propolisin en güçlü antioksidan bileşenlerinden biridir (Farooqui vd., 2010).

Antioksidan aktivite farklı birimlerde ölçülmektedir. Farklı besinlerin antioksidan aktiviteleri ORAC indeksleri ile karşılaştırılır. ORAC indeksi Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi'nin kısaltılmış halidir. 2007 ABD Patentine göre kavak propolisinin 50/50 su/aseton ekstresi 2459 ORAC birimi ile gösterilirken, hekzan/etilasetat (75:25) ekstresi 7215 ORAC birimi ile gösterilir. Saf propolis reçinesi 9674 ORAC birimi ile ($\mu\text{mole TE/g}$) gösterilmektedir. Uruguay kavak propolisi ise benzer şekilde yüksektir: 8000 $\mu\text{mol TE/g}$ propolis. Böylece propolis en güçlü doğal antioksidanlardan biridir (Silva vd., 2011).

Propolis güçlü bir antioksidandır. Bu etkisi, fenolik ve antioksidan bileşenlerin yüksek konsantrasyonuna bağlıdır. İnsan fizyolojisindeki radikal

teorisine göre etkin serbest radikaller, hücresel parçalanma süreçleri ve hücre ölümlerinin birçoğunda görev almaktadır. Kanser, otoimmün hastalıklar, yaşlanma, katarakt, romatoid artirit, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik ve dejeneratif hastalıkların gelişiminde oksidatif stres temel nedendir. Propolis, kanser gibi kronik dejenerasyon hastalıklardan korunmada bir takviye olarak görülmektedir (Pham-Huy vd., 2008).

5.5.4.2. Karaciğer Koruyucu Aktivite ve Radyasyon Karşıtı Aktivite

Kanı toksinlerden arındırma görevini üstlenen organ olan karaciğer hasara uğradığında, çeşitli kronik hastalıklar ve kan zehirlenmesi riski oluşmaktadır. Fenolik bileşikler karaciğer koruyucu fonksiyonları ile bilinirler. Farklı propolis türleri için antioksidan aktivitesine bağlı olarak karaciğer koruyucu etkisinin var olduğu rapor edilmiştir (Banskota vd., 2001).

Propolisin radyasyon karşıtı aktivitesi ise 2010 yılında araştırılmıştır. Tümör hücrelerinde ve hayvanlarda test edildiği üzere, bir antioksidan olan propolis radyasyon etkisini yok etmede güçlü bir etkiye sahiptir. Ayrıca kanser hücrelerinin apoptozisinde görev almaktadır ve böylece radyasyonun anti kanser etkisini geliştirmektedir (Orsolich, 2010).

Propolis takviyesi, karaciğer sağlığı ve tümör ışın tedavisinin zararlı etkilerinin yok edilmesi için koruyucu ilaştır (Bogdanov, 2014).

5.5.5. Bağışıklık Sisteminin Gücünü Düzenleme Etkileri

Tüm propolis tipleri bağışıklık uyarıcı etkiye sahipken, farklı propolis türlerinin aktif bileşenleri de birbirinden farklıdır. Propolisin bağışıklık düzenleyici etkisi, fareye ait peritoneal makrofajların mikropları yok edici etkisinin artması ve antikor üretiminin artışı ile beraber tümör hücrelerine karşı doğal öldürücü hücrelerin litik aktivitesinin artması şeklinde gerçekleşmektedir. Propolisin en iyi bağışıklık uyarıcı aktivitesi kısa dönemli olarak hayvanlara uygulandığında gözlenmiştir.

Propolis, antikor üretimini arttırarak T ve B lenfositlerini aktive ederek bir adjuvan gibi görev alır ve bağışıklık sistemini uyarır. Propolis, bağışıklık sisteminin uyarılması ve düzenlenmesinde bir takviye olarak görülmektedir (Sforcin vd., 2007).

5.5.6. Antitümör Etkileri

Propolisin hastalıkların tekrarının önlenmesinde kullanılma sebebi, tümör hücrelerinde DNA sentezini inhibe edebilme yeteneğinde olması, tümör hücrelerinin apoptozunu tetikleme yeteneğinde olması, B, T ve NK hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleme yeteneğindeki faktörleri üretebilmeleri için makrofajları aktive etme özelliğinde olmasıdır. Özellikle propolis içeriğindeki flavanoitler, farelerde kemoterapi ya da radyasyon içindeki ajanların toksisitelerine karşı koruyucu rol oynamaktadır. Bu etkiyi insanlarda da gösterebilecekleri şeklinde umut vermektedir. Bir adjuvan antioksidan terapisi ile kombinasyonu lökositler, karaciğer ve böbrekler üzerindeki yan etkileri düzelterek sonuçta doz artışına engel olup kemoterapinin etkisini arttırabilir.

Birçok polifenol antimetastik aktiviteye sahipken, kavak propolisindeki CAPE bileşeni ve baccharis propolisindeki Artepillin C, en potansiyel antitümör ajanları olarak tanımlanmıştır. Propolis, kanserden korunmada besin takviyesi olarak görülmektedir (Orsolice, 2010).

5.5.7. Antiinflammatuar Etki

Propolis, gine domuzu mast hücrelerinden miyeloperoksidaz aktivitesi, NADPH –oksidaz ornitin dekarboksilaz, tirozin protein kinaz ve hyaluronidaz aktivitelerini inhibe etmektedir. Bu antiinflammatuar etki aktif flavanoitlerin ve sinamik asit türevlerinin varlığı ile açıklanabilir (Almeida vd., 2002).

Propolisin etanol ekstresi, *in vitro* fare peritoneal makrofajlarının prostaglandin ve lökotrien üretimini ve *in vivo* zimosan ile uyarılmış akut peritoneal inflamasyonu baskılar. Propolisin beslenme yolu ile alınması, özellikle *in vivo* inflamasyonun araşidonik asit metabolizmasının lipoksigenaz yolağını

baskılar. Araşidonik asit metabolizmasında CAPE, kafeik asit, kersetin ve naringenine göre daha potansiyel bir düzenleyicidir (Mirzoeva vd., 1996).

Baccharis propolisi, mikroglia hücrelerinde oksijen yetersizliği sonucu uyarılmış nöroinflamatuvar cevapları, NF-kappa B aktivasyonunun inhibe edilmesi yoluyla baskılar. NF-kappa B aktivasyonundan, mitokondriler tarafından gerçekleştirilen artan ROS üretimi sorumludur. Bu nedenle propolis, oksijen yetersizliği sonucu uyarılan nöroinflamasyonlardan korunmada faydalı bir takviye olabilir (Wu vd., 2013).

5.6. Propolis ile Hazırlanan Ürünler

Propolis Tableti

Propolisin sarımsak ve vitamin C ile karıştırılarak hazırlanan tablet sekli soğuk algınlığına ve gribe karşı kullanılır.

Propolis Kapsülleri

Propolis kapsülleri çeşitli enfeksiyonlara karşı vücudun bağışıklığını arttırmak için kullanılmaktadır.

Propolis Dudak Kremi

Propolise E vitamini eklenerek elde edilen dudak kremi, dudakları yumuşatmak ve iyileştirmek için kullanılmaktadır. Ayrıca çatlaklardan, güneş ve rüzgar yanıklarından da korumaktadır.

Propolis Diş Macunu

Propolis ve çay ağacı yağı içermekte ve bakteriyel enfeksiyonlara, diş çürümelerine, ağız temizliğine ve bakımına, diş eti kanamalarına ve diş eti çekilmesine karşı iyileştirme sağlar.

Propolis Alkol Eriyiği

Sürtünmeden oluşan yaraları, yanıkları, tahrişleri ve enfeksiyonları giderici olarak haricen kullanılır. Haricen kullanım yanında bir çay kaşığı balla birlikte ağız yoluyla da alınabilir.

Propolis Ağız Spreyi

Propolis ve alkolle hazırlanan bu ürün bakterilere karşı kullanılır. Ayrıca ağız enfeksiyonu sonucu oluşan kokuları giderir, nefes tazeleyici özellik taşır.

Ekstra Güçlü Propolis Alkol Eriyiği

İki kere daha konsantre standart propolis alkol eriysi içerir. Her bir ml eriyik 325 mg taze propolise eşdeğerdır. Bu eriyik suda erimeye hazır durumda olup aynı zamanda doğrudan deriye uygulanmaktadır.

Propolis Özü

Alkolsüz hazırlanan bu eriyik genellikle dahilen kullanım için anti-bakteriyel, anti-mikotik (mantarlara karşı) ve anti-viral olarak ağız ve mide hastalıklarına karşı kullanılmakta, bağırsak problemlerini rahatlatmaktadır.

Propolis ve Bal Karışımı

Propolis ve bal karışımı olan bu ürün deri yanıkları, tahriş ve enfeksiyonlara karşı, ülser ve iyileşmeyen inatçı ağrıları, mide sorunlarını gidermede, bağırsıklığı güçlendirmede etkilidir.

Propolis ve Çay Ağacı Merhemi

Deride görülen, tahriş, egzama ve mantar hastalıkları ve yanıklardan sonra doku iyileşmesi için uygundur.

Propolis sabunu

Manuka balı ve çay ağacı yağı ile etkin anti bakteriyel maddeler içeren karışım, tamamen doğal antiseptik yıkama için hazırlanmıştır.

Propolis Ekstresi

Saf propolis konsantresi (%100) ve şıfalı bitkileri içeren, alkol bulunmayan karışım, 10 damlasında 500 mg propolis, 500 mg bitki içermektedir. Serin ve kuru yerde korunmalıdır. Günde 5-10 damla doğrudan veya herhangi bir içeceklerle karıştırılarak kullanılır.

Propolis Eriyiği

Her kullanım dozunda %50 etil alkol içeren 1.25 ml propolis eriysi bulunmektedir. Günde 1/8-1/4 ay kaşığı kullanım dozu olarak önerilmektedir.

Propolis Konsantre zü

Saf konsantre propolis özü (%100) bal arısı tarafından enzimatik olarak üretilen bir besin maddesidir. Bir tableti 500 mg propolise eş değer miktarda %100 saf propolis içermektedir. Günde 1 tablet olarak kullanılmalıdır.

Propolis Jeli

Amino asit ve vitamin değerleri yüksek propolis jeli, sa derisinin yağ üretimini dengelemede ve dinlendirmede, kaşıntı ve tahrişleri gidermede, zararlı mikroorganizmaların sa diplerinden temizlenmesinde etkilidir.

Propolis Tozu

Propolis tozu menopoz devresi ve sonrası kemik erimelerine karşı, st solunum yolu rahatsızlıklarında, kulak, burun, boğaz, astım, bronşit gibi rahatsızlıklarda, romatizmal ağrılar ve eklem ağrılarında, kötü nefes kokularını giderici, diş etlerindeki bakterilerin yok edilmesinde kullanılmaktadır.

Sıvılaştırılmış Saf Propolis

Ağız hastalıklarının tedavisinde, diş ağrılarına karşı, ciltteki kaşıntı, beriberi, ülser ve yaraların tedavisinde, rinit tedavisinde, kanser tedavisinde, iç organlardaki ülserin tedavisinde, kandaki şeker ve yağ seviyelerini düşürmede, damar sertliğini gidermede ve diğer kan ve damar hastalıklarının tedavisinde, toksinleri atma, kanı temizleme, kalbi güçlendirme ve bağışıklığı arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Kumova vd., 2002).

6. MATERYAL VE METOT

6.1. Materyal

6.1.1. Kullanılan Aletler

- Nanosizer (Malvern ZEN3600 Zetasizer Nanoseries)
- Krüss Optronic DR301-95 Refraktrometre cihazı
- Sonikatör, Everest Ultrasonic Cleanex-812
- Sineo Mikrodalga MDS -8G Kapalı Tank Parçalama/Ekstraksiyon Sistemi
- Manyetik karıştırıcı (IKA C-MAG HS 7)
- Taramalı Elektron Mikroskobu FEI Quanta 250 FEG
- Emitech K550X- Sputter Coater
- DSC Perkin Elmer 8000
- Thermo Scientific Accela UPLC DAD

6.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Doğal Maddeler

- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Dietyl eter (Merck)
- Folin Ciocalteu's Fenol reaktifi (Merck)

- Sodyum karbonat (Applichem)
- Kolesterol
- Tween 80 (Merck)
- Spectra Biotech Selüloz Ester 100-500 Da diyaliz membranı
- Asetonitril (Sigma)
- Tetrahidrofüran (Sigma)
- ACE 5 C18 250x4.6 mm kolon
- Diklorometan (Merck)
- Formik Asit (Merck)
- Kloroform (Merck)
- Dötorolu Dimetilsülfoksit (DMSO-d6)
- Propolis, Ağustos 2013 (Sivas, Yıldızeli)
- Reaktifler: Asetik asit solüsyonu (%60 v/v), piridin solüsyonu (%20, v/v), alimünyum klorit solüsyonu (%5, v/v)



Şekil 8: Ağustos 2013 tarihinde Sivas, Yıldızeli'nden toplanmış propolis

6.2. Metot

6.2.1. Propolis Ekstraksiyonu

Toz haline getirilen propolis, geleneksel maserasyon yönteminin dışında literatürde yapılan çalışmaların sonuçları doğrultusunda Tablo 8' de gösterilen hızlı ve etkin olabilecek 3 farklı ekstraksiyon yöntemi ve 2 farklı sıcaklık değeri kullanılarak ekstre edilmiştir (Trusheva vd., 2007, Ramanauskiene vd., 2013). Solvent olarak düşük toksisitesi olması dolayısıyla %96 saflıkta etanol tercih edilmiştir (Arslan vd., 2010). Ekstraksiyon %96 saflıkta etanol ile 1:10 (m/v) propolis: solvent oranı kullanılarak hazırlanmıştır (Trusheva vd., 2007). Ayrıca sıcaklığın etkisinin belirlenebilmesi için 30 ve 60 °C lik iki sıcaklık denenmiştir (Paviani vd., 2013).

6.2.1.1. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon için literatürde belirlenen prosesten uyarlanan 100 W' da 30 dakikalık bir proses tercih edilmiştir (Trusheva vd., 2007). Everest Ultrasonic Cleanex-812 sonikatör cihazı ile belirlenen sıcaklıklarda ekstraksiyon uygulanmıştır.

6.2.1.2. Mikrodalga ekstraksiyonu

Mikrodalga ekstraksiyon için literatürden hareketle 800 W' da 15 dakikalık bir proses tercih edilmiştir (Trusheva vd., 2007). Sineo Mikrodalga MDS -8G kapalı tank parçalama/ekstraksiyon sistemi kullanılarak belirlenen sıcaklıklarda ve sıcaklık ölçümü için etanol kullanılarak ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.

6.2.1.3. Manyetik karıştırma ekstraksiyonu

Manyetik karıştırma ekstraksiyonu için literatür ışığında alınan bilgiler doğrultusunda 120 dakika 400 rpm' lik bir proses tercih edilmiştir (Ramanauskiene vd., 2013). Manyetik karıştırıcı (IKA C-MAG HS 7) cihazı kullanılarak belirlenen sıcaklıklarda ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.

Tablo 8. Ekstraksiyon işleminde uygulanan yöntem, süre ve sıcaklıklar

Ekstraksiyon Yöntemi	Süre (dakika)	Sıcaklık 1 (°C)	Sıcaklık 2 (°C)
Ultrasonik banyo (100 W)	30	30	60
Mikrodalga (800W)	15	30	60
Manyetik karıştırma	120	30	60

Ekstraksiyon işleminin ardından örnekler filtre kağıdı ile süzülürerek katı kısım tartılmıştır.

6.2.2. En Uygun Ekstraksiyon Yöntemini Belirleme

Gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri verim yönünden değerlendirilmiştir. Ardından toplam fenol ve flavanoit içeriklerinin ölçülmesi ile en yüksek verime sahip, toplam fenol ve flavanoit içerikleri en yüksek olan yöntem seçilmiştir.

6.2.2.1. Ekstraksiyon Verimi Hesaplama

Ekstraksiyon verimi, işleme tabi tutulan katı miktardan ekstraksiyon sonrası süzülerek filtre kağıdında kalan katı miktarının çıkarılıp, yüzdesel olarak hesaplanması ile elde edilmiştir.

Ekstraksiyon verimi

$$= \frac{\text{İlk konulan katı miktarı} - \text{Filtre kağıdında kalan katı miktarı}}{\text{İlk konulan katı miktarı} * 100}$$

6.2.3. Propolis Ekstresinin Toplam Fenol ve Flavanoit Tayini

6.2.3.1. Toplam Fenol Tayini

Ekstre içerisindeki toplam fenol tayini ölçümü yapabilmek için ekstre nin mg/ml EtOH olarak konsantrasyonunun bilinmesi gereklidir. Tablo 9’ da gösterildiği şekilde bileşenler eklenip karıştırılmıştır. Vortekslenip 5 dakika bekletilmiştir. Ardından %20’ lik Na₂CO₃ stoğundan 1,5 ml çekilip eklenmiştir. 1 saat süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilen örnekler ile 760 nm’ de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

Tablo 9. Toplam Fenol Tayini Protokolü

	Kör	Ekstre
Ekstre (ml)	-	0.10
Distile su (ml)	10.0	9.90
Folin Reaktifi (ml)	0.50	0.50

Spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisine konarak konsantrasyon hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisi için standart olarak gallik asit (GAE) kullanılmıştır.

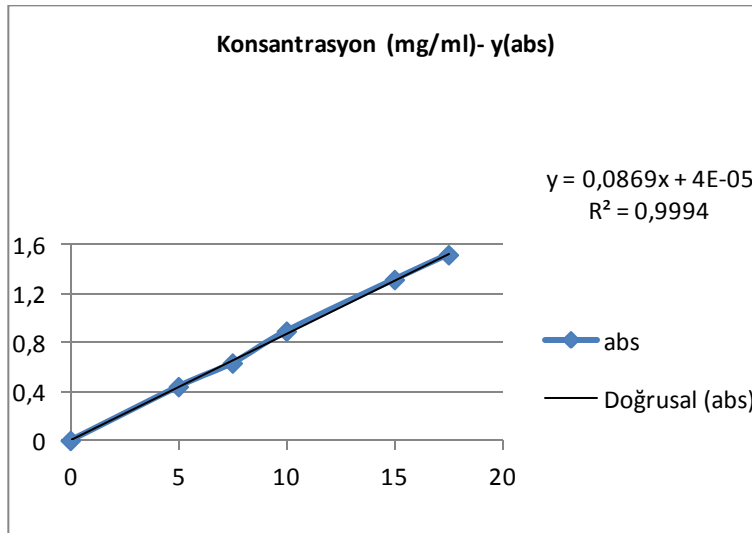
Elde edilecek toplam fenol içeriği değeri mg GAE/g ekstre cinsindedir.

❖ Gallik Asit Standart Eğrisinin Çıkarılması

5 mg/ml konsantrasyondaki gallik asit stoğundan 0, 5, 7.5, 10, 15, 17.5 mg/ml lik çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Ardından 100 µl çalışma solüsyonlarından alınıp fenol tayini yaparken kullanılan protokol uygulanmıştır (Tablo 9.) Spektrofotometrede 760 nm' de yapılan ölçümler denklemde yerine konulmuştur.

Ölçülen absorbans değerlerine karşı konsantrasyon değerlerinin grafiği çıkarılmıştır (Şekil 9). Grafiğe ait denklem, toplam fenol içeriğinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



Şekil 9. Gallik asit standart eğrisi

6.2.3.2. Toplam Flavanoit Analizi

Yöntemin prensibi, alüminyum iyonlarının örnek içerisindeki flavanoitlerle etkileşip stabil Al^{+3} -flavanoit kompleksi oluşturması ve flavanoit konsantrasyonuna bağlı olarak yoğunluğu değişen sarı renk ile vermesidir. Oluşan reaksiyon, örnekte bulunan fenolik bileşenlerden etkilenmeden absorpsiyonun ölçümünü sağlar. Reaktifler kullanılacağı kadar hazırlanıp, taze olarak kullanılır.

Toz halindeki örnek %80' lik metanol ile ekstre edilmiştir. Son ekstre konsantrasyonu 1 mg/mL değerindedir. Flavanoitleri belirlemek için deney tüpüne, 500 µL ekstre, 500 µL asetik asit solüsyonu, 2 mL piridin solüsyonu, 1 ml alüminyum klorit solüsyonu ve 6 ml %80' lik metanol eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Ardından 420 nm' de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır.

Spektrofotometrik ölçümler rutin kalibrasyon eğrisine konularak toplam flavanoit içeriği mg rutin (RE)/g ekstre cinsinden hesaplanmıştır. (Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim vd., 2012).

6.2.4. Propolisin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi ile Analizi

Propolisin termal özellikleri diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC, Perkin Elmer, model DSC 8000) ile analiz edilmiştir. Yaklaşık 5 mg liyofilize ekstre örneği, standart alüminyum panlara yüklenip sıkıştırılmıştır. Analiz 20-200°C aralığında 10 °C /dk sıcaklık artışı ile yürütülmüştür.

6.2.5. Propolisin UV spektrofotometresi ile Analizi

Propolise ait UV spektrumu çekebilmek için öncelikle bir stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyonun konsantrasyonu 2 mg/ml dir. Stok içerisinden 10 µl çekip, üzeri fosfat tamponu ile tamamlanarak UV spektrofotometresi cihazında 200-900 nm arasında tarama yapılmıştır.

6.2.6. Propolisin ¹H-NMR Spektrofotometresi ile Analizi

Propolise ait ultrasonik ekstraksiyon örneği liyofilize edildikten sonra ¹H-NMR çekilmiştir. 10 mg kadar örnek, 400 MHz işletim frekanslı sıvı MERCURYplus-AS 400 model ¹H-NMR spektrofotometresi ile analiz edilmiştir. Çözücü olarak DMSO-d₆ kullanılmıştır.

6.2.7. Propolis İçerisindeki Major Bileşenin İzolasyonu

Propolis ekstresindeki major bileşenler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla ince tabaka kromatografisi (İTK) yönteminden yararlanılmıştır.

6.2.7.1. Uygun Solvent Sisteminin Belirlenmesi

İTK işleminden önce yürütülecek solvent sisteminin belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle önce ekstre nokta tatbik yapılarak Silika jel F254 20x20 cm (Merck) plaklara uygulanmıştır. Ekstrenin polaritesine uygun solvent karışımını bulana kadar denemeler yapılmıştır. Bantların en iyi ayrıldığı sistem uygun solvent sistemi olarak seçilmiştir.

Propolis ekstresi ile İTK yapabilmek için denenen solvent sistemleri şu şekildedir.

- ❖ 100:11:11:26 (Etil asetat: Formik asit: Asetik asit: Su)
- ❖ 100: 17. 5: 13.5 (Etil asetat: Metanol: Su) 1-2 damla asetik asit
- ❖ 80: 20: 2 (kloroform: metanol: su)
- ❖ 90: 10 (diklorometan: metanol)
- ❖ 95: 5 (diklorometan: metanol)
- ❖ 98: 2 (diklorometan: metanol)

Yapılan denemelerden sonra en iyi ayırımın görüldüğü solvent sistemi 95:5 diklorometan: metanol İTK çalışmaları için seçilmiştir.

6.2.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Ekstre ya da örnek nokta ya da çizgi tatbik yapılarak Silika jel F254 20x20 cm (Merck) plaklara uygulanmıştır. Silika jel plakalar uygulanacak örnek sayısına göre uygun genişliklerde kesilmiştir. Tatbik yapıldıktan sonra, belirlenen solvent sisteminde yürütme işlemi gerçekleştirilerek polaritelerine göre ayrılmaları sağlanmıştır. Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra UV altında 254 nm ve 366 nm lere UV aktif bileşenler görüntülenmiştir. Devamında UV aktif olmayan bileşikler %30' luk sülfürik asit (H_2SO_4) püskürtülerek hot plate'lerde ısıtarak lekeler görünür haline getirilmiştir.

6.2.7.3. Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK)

Yüksek performans ince tabaka kromatografisi (YPİTK) işlemi, ince tabaka kromatografisinin geliştirilmiş halidir. YPİTK plakları, İTK plaklarından daha küçük partikül boyutlarına sahip olduğundan, daha iyi ayırım sağlarlar. Ayrıca bir plate üzerine daha fazla örnek uygulanabilir. Plakların küçüklüğü ve yürütme mesafesinin azlığı sayesinde solvent tüketimi ve süre azalmaktadır.

Ekstre cam YPİTK Silika jel F254 20x20 cm plaklar üzerine üç ayrı çizgi tatbik şeklinde uygulanmıştır. Ardından diklorometan: metanol (95:5) solvent sisteminde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Plaka üzerine Natural Products- Polietilen glikol reagent (NP/PEG) püskürtülerek UV lamba altında 365 nm' de görüntülenmiştir. İşlem sonucunda gözlenen sarı renk flavanoitleri, sarı mavi renk ise basit fenolik bileşikleri işaret etmektedir.

6.2.7.4. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (Prep-İTK)

Propolis ekstresi, Silika jel F254 20x20 cm (Merck) plaklar üzerine çizgi tatbik yapılarak uygulanmıştır. İşlem 5 ayrı plak için tekrarlanmıştır. Tatbik yapılan plakalar diklorometan: metanol (95:5) sisteminde yaklaşık 20 ml kadar çözgünde yürütülmüştür. Çözgen sisteminin plak sonuna 0.5 cm boşluk kalana dek yürütmesine müsaade edilmiştir.

Plak üzerinde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV aktif bileşenler UV lamba altında incelenmiştir. Preparatif sistemde ayrılan ve 254 nm de görülen bantlar, kurşun kalem ile işaretlenmiş ve yukarıdan aşağıya doğru numaralandırılmıştır. İşaretlenen kısımlar makasla dikkatlice kesilip bir vial içerisine alınmıştır. Kesilen parçalar, metanol içerisinde çözündürülmüştür. Kromatografi işlemi İTK ile takip edilmiştir.

6.2.7.5. Poliamid Kolon Kromatografisi

Preparatif İTK ile ayrıştırılamayan maddeler için kolon kromatografisi kullanılmıştır. Fenolik ve polifenolik fonksiyonel grupları içeren doğal ürünlerin izolasyonu için şişme kabiliyeti bulunan poliamid tercih edilmektedir. Bir miktar poliamid alınıp üzerine distile su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırmaya 1 gece şişmesi beklenmiştir.

Şişirilen poliamid, küçük çaplı bir şırınga içerisine doldurulmuştur. Ekstre, poliamid kolon kromatografisine uygulanmıştır. Sudan başlayarak metanole ve ardından da diklorometana doğru giden çeşitli elüsyonlarla fraksiyonlar alınmıştır. Uygulamada sırasıyla 8:2 su: metanol, 40:60 metanol:su, 60:40 metanol:su, 80:20 metanol:su, %100 metanol, 80:20 metanol:diklorometan, 50:50 metanol:diklorometan, %100 diklorometan hareketli fazları kullanılmıştır. Elüsyon her seferinde 50 ml elüent geçirilerek fraksiyonlar yaklaşık 5'er ml olacak şekilde tüplerde toplanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 10). Kromatografi işlemi ve toplanan fraksiyonlar İTK ile takip edilmiştir.



Şekil 10: Poliamid kolon kromatografisi deney düzeneği

6.2.7.6. RP Kolon Kromatografisi

Uygulama için bir miktar RP (karşıt faz Silika jel) C18, 20 ml %50 metanol-%50 su ile şartlandırılarak küçük çaplı bir şırınga içerisine doldurulmuştur. Ekstre, RP-C18 kromatografisine uygulanmış, metanol-su karışımı ile başlayıp metanole doğru giden çeşitli elüsyonlarla fraksiyonlar alınmıştır. Uygulamada sırasıyla %50 metanol-%50 su, %60 metanol-%40 su ve %70 metanol-%30 su hareketli fazları kullanılmıştır. Elüsyon her seferinde 50 ml elüent geçirilerek fraksiyonlar yaklaşık 5'er ml olacak şekilde tüplerde toplanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 11). Kromatografi işlemi ve toplanan fraksiyonlar İTK ile takip edilmiştir.



Şekil 11: RP Kolon kromatografisi deney düzeneği

6.2.7.7. Partisyon İşlemi

Örnek üzerine bir miktar su, metanol ve diklorometan eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra 3500 rpm de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Diklorometan fazı alınıp kurutulmuş ve miktar tayini yapılmıştır. Ardından örneğin $^1\text{H-NMR}$ 'ı çekilmiştir.

6.2.8. İzole Edilen Bileşenin Karakterizasyonu

İzolasyonu gerçekleştirilen maddenin karakterizasyonunun yapılabilmesi için $^1\text{H-NMR}$ ve LC-ESI-MS tekniklerinden yararlanılmıştır.

6.2.8.1. $^1\text{H-NMR}$

İzole edilen örneğin yapı tayini için spektral yöntem ($^1\text{H-NMR}$) kullanılmıştır. Analizler MERCURY-Plus AS400 (400 MHz) cihazında gerçekleştirilmiştir. Örnekleri çözmek için DMSO-d₆ kullanılmıştır.

6.2.8.2. LC-ESI-MS

Pozitif ve negatif modlarda 100-1000 dalton aralığındaki kütleler için mertebelerine kadar çekilen LC-ESI-MS çekilerek izole edilen molekülün molekül kütlesi belirlenmiştir. $^1\text{H-NMR}$ verileriyle de desteklenerek maddenin yapısı tespit edilmiştir.

6.2.8.3. UPLC

Yükleme veriminin hesaplanabilmesi için UPLC tekniğinden yararlanılmıştır. Thermo Accela UPLC cihazında yöntem belirleme çalışması yapılmıştır. Verza vd. (2011) yayınında yer alan yöntemde bazı değişikliklere gidilmiştir. Mobil faz olarak Asetonitril (ACN) ve %1 Tetrahidrofuran (THF) içeren su (pH:3 H₃PO₄ ile) Tablo 10' da gösterilen gradient ve sürelerde kullanılmıştır. 0.5 ppm, 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm' lik standartlar hazırlanmıştır. Analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Tablo 10.UPLC yöntemine ait hareketli faz sistemi ve zaman çizelgesi

Dakika	B (ACN)	A (%1 THF li su pH:3)
0	30	70
8	30	70
11	100	0
15	100	0

Kolon: ACE 5 C18 250x4.6 mm kolon

Akış hızı: 1.2 ml/dakika

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

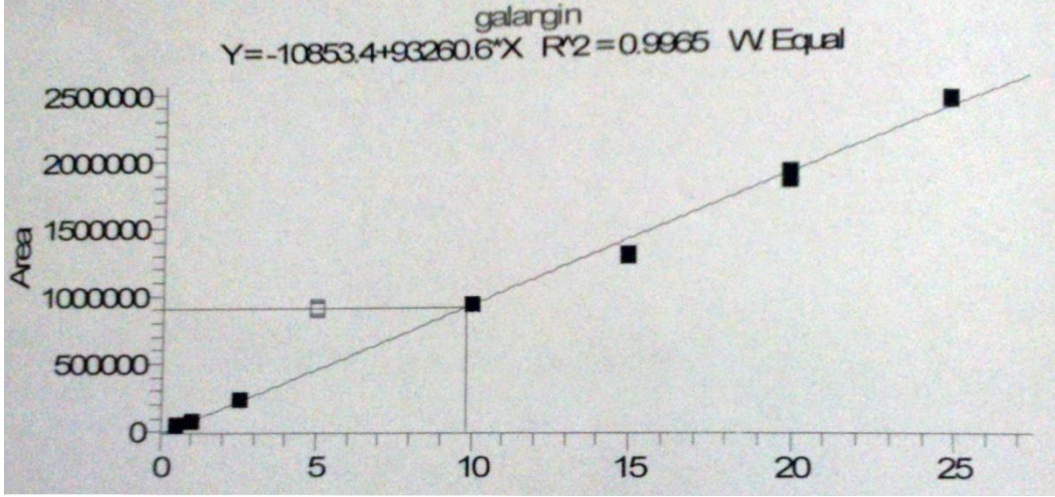
❖ Geliştirilen UPLC Yöntemine ait Dedeksiyon Sınırı ve Kantitatif Ölçme Sınırının Hesaplanması

Dedeksiyon sınırı (LOD): Makul bir kararlılıkla ölçülebilen en düşük içeriktir. Tipik olarak S/N (sinyal/gürültü)' nün 3 katıdır.

Kantitatif ölçme sınırı (LOQ): Uygulanan test koşulları altında, kabul edilebilir hassasiyet (tekrarlanabilirlik) ve doğrulukla tayin edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. Tipik olarak S/N (sinyal/gürültü)' nün 10 katıdır.

❖ Geliştirilen UPLC Yöntemi ile Galangine ait Standart Eğrinin Çıkarılması

Galangine ait hazırlanan 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 ve 25 ppm' lik stok çözeltiler seçilen yöntemle (Tablo 10) üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Ardından Xcalibur programına standart eğri çizdirilmiştir (Şekil 12). 5 ppm değerindeki örnek standart eğrinin dışında kaldığından göz ardı edilmiştir.



Şekil 12. UPLC yöntemi ile elde edilen galangin standart eğrisi (0-25 ppm)

$$Y = -10853.4 + 93260.6 * X$$

$$R^2 = 0.9965$$

6.2.9. Formülasyon Çalışmaları

Niozomlar eter enjeksiyonu yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Niozomların oluşturulması için ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Partikül boyutunu etkileyen temel faktörler, literatürden surfaktan oranı (Jadon vd., 2009), uçurma sıcaklığı (Rangasamy vd., 2008) ve sonifikasyon süresi (Ruckmani vd., 2010) olarak seçilmiştir. Ardından Design Expert programı yardımı ile bir deney seti oluşturularak minimum partikül boyutunu verecek olan deney dizilimi elde edilmiştir. Yüklenecek etkin madde miktarının da seçilmesi ile birlikte niozomlar elde edilmiştir.

6.2.9.1. Etkin Madde İçermeyen Niozom Formülasyonunun Hazırlanması

Surfaktan oranı, uçurma sıcaklığı ve sonifikasyon süresi parametrelerine bağlı olarak Design Expert Yazılımında Box-Behnken tasarımı kullanılarak bir deney seti oluşturulmuştur (Şekil 13). Parametrelere ilişkin aralık Tablo 11’deki gibi belirlenmiştir. Cevap çıktısı olarak ise partikül boyutu kullanılmıştır.

Tablo 11. Deney seti oluşturmak için kullanılan parametrelere ait minimum ve maksimum değerler

	Minimum	Maksimum
Surfaktan oranı	1	10
Uçurma Sıcaklığı (°C)	40	60
Sonifikasyon Süresi (dakika)	30	60

Factor 1 A:Surfactant ratio %	Factor 2 B:Time min	Factor 3 C:Temperature C
0.00	30.00	50.00
5.00	60.00	40.00
5.00	45.00	50.00
10.00	60.00	50.00
5.00	45.00	50.00
5.00	30.00	60.00
10.00	45.00	60.00
0.00	45.00	60.00
0.00	45.00	40.00
10.00	30.00	50.00
5.00	30.00	40.00
0.00	60.00	50.00
5.00	60.00	60.00
5.00	45.00	50.00
10.00	45.00	40.00

Şekil 13.Kullandığımız deney deseni

Niozomların hazırlanması için eter enjeksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Modelde türetildiği şekilde 50 ml' lik beher içine 50 mg kolesterol ve modelde türetilen orana uygun hacimde (Şekil 13) Tween 80 konulup hazırlanmıştır. Karışım 10 ml dietil eter içerisinde çözülmüş ve çözelti, 10 ml PBS (pH 7.4) bulunduran bir behere yavaşça enjekte edilmiştir. Enjeksiyon süresince sıcaklık modelde belirlendiği şekilde tutulmuştur. Fazlar arasındaki sıcaklık farkı eterin hızlı buharlaşmasına neden olmuş ve spontan vezikülasyon ile sonuçlanmıştır. Ardından belirlenen dakika süresince sonikasyon işlemi uygulanmıştır.

6.2.9.2. Propolis İçeren Niozom Formülasyonunun Hazırlanması

Literatürden kullanılacak ilaç miktarı aralığı 10-50 mg olarak bulunmuştur (Jadon, P.S., vd., 2009) Buna uygun olarak, modelden seçilen optimum şartlarda üretim gerçekleştirilmiştir. 50 ml' lik beher içine 50 mg kolesterol ve 5.61 oranında (262 µl) Tween 80 konulup hazırlanmıştır. Karışım 10 ml dietil eter içerisinde çözülmüştür ve çözelti, 10 ml PBS (pH 7.4) içinde sırasıyla 10 mg, 30 mg ve 50 mg etkin maddeyi içeren bir behere yavaşça enjekte edilmiştir. Enjeksiyon süresince sıcaklık modelde belirlendiği şekilde tutulmuştur. Fazlar

arasındaki sıcaklık farkı eterin hızlı buharlaşmasına neden olmakta ve spontan vezikülasyon ile sonuçlanmaktadır. Ardından belirlenen dakika süresince sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Üretilen formülasyonlar Şekil 14’ de gösterilmiştir.



Şekil 14.Soldan sağa sırasıyla boş partikül, 1 mg/ml propolis ekstresi yüklü partikül, 3 mg/ml propolis ekstresi yüklü partikül, 5mg/ml propolis ekstresi yüklü partiküle ait görüntü

6.2.10. Niozom Formülasyonunun Karakterizasyonu

6.2.10.1. Partikül Boyutu Analizi

Hazırlanan örneklerin partikül boyutları Malvern Nanosizer cihazı ile ölçülmüştür. Ölçümün yapılabilmesi için yazılıma belirtilmesi gereken refraktif indeks değeri daha önceden karışımın içeriğine göre Krüss Optronik cihazı ile ölçülmüştür.

6.2.10.2. Niozom Formülasyonunun Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) niozomların morfolojisini belirlemek üzere kullanılır. SEM fotoğrafları FEI Quanta 250 FEG taramalı elektron mikroskobu ile gereken büyütmelemlerde ve oda sıcaklığında çekilmiştir. Gözlem yapmadan önce, liyofilize örnekler çift taraflı yapışkan bant ile metal gridler üzerine tutturulmuştur ve Emitech K550X sputter coater ile vakum altında 1 dk bekletilerek altınla kaplanmıştır.

6.2.10.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi

Ekstre içeren ve içermeyen niozom formülasyonlarının termal özellikleri diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC, Perkin Elmer, model DSC 8000) ile analiz edilmiştir. Yaklaşık 5 mg liyofilize örnek, standart alüminyum panlara yüklenip sıkıştırılmıştır. Analiz 20-200 °C aralığında 10 °C /dk sıcaklık artışı ile yürütülmüştür.

6.2.11. Yükleme Verimi

Propolis içeren niozom formülasyonu belirlenen şartlarda hazırlanmıştır. 9000 rpm de 30 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant alınarak UPLC ile analiz edilmiştir. Yükleme verimi hesaplanmıştır.

Yükleme verimi= (enkapsüle edilen ilaç miktarı/toplam ilaç miktarı)*100

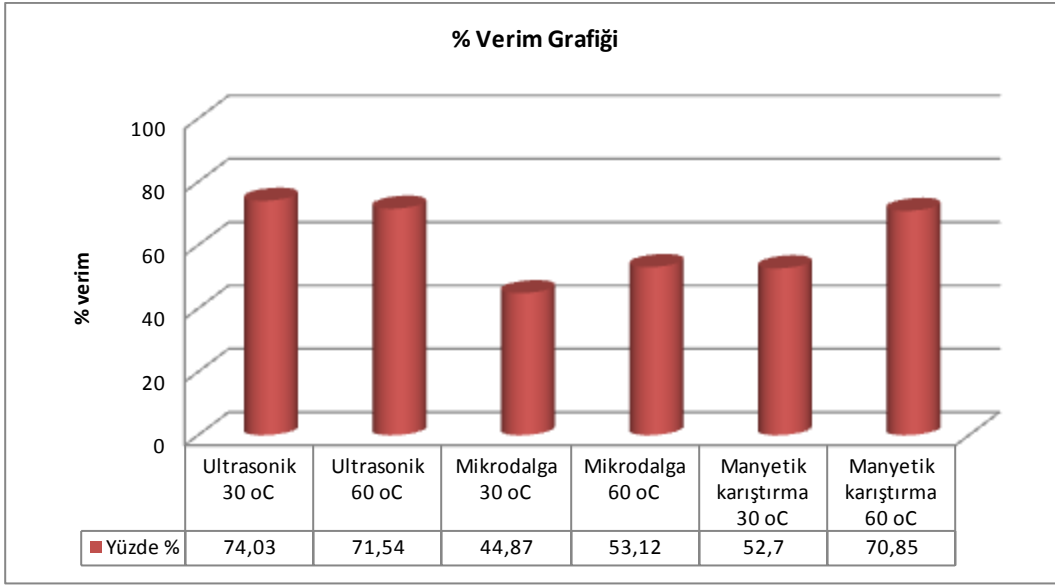
7. SONUÇ VE TARTIŞMA

7.1. Ekstraksiyon Yöntemlerine Ait Verim Sonuçları

Tablo 12.Farklı ekstraksiyon metotları için verim sonuçları

Yöntem	%Verim
Ultrasonik 30 °C	74.03
Ultrasonik 60 °C	71.54
Mikrodalga 30 °C	44.87
Mikrodalga 60 °C	53.12
Manyetik karıştırma 30 °C	52.70
Manyetik karıştırma 60 °C	70.85

Yapılan verim hesaplamalarına göre Tablo 12’ de görüldüğü üzere en uygun ekstraksiyon yöntemi 100 W’ da 30 dakika süre ile 30 °C’ de gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyondur (Şekil 15). Elde edilen bu bulgu, Trusheva vd. (2007) yayınında belirtilen sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir. Mikrodalga ekstraksiyonu, düşük zaman ve az iş gücü gerektirmesine rağmen düşük verime sahiptir.



Şekil 15.Farklı ekstraksiyon yöntemleri için verim sonuçları ve grafiksel gösterimi

7.2. Toplam Fenol ve Flavanoit İçeriği Hesaplama Sonuçları

7.2.1. Toplam Fenol İçeriği

Tablo 13.Farklı ekstraksiyon metotlarına ait toplam fenol içeriği sonuçları

Ekstraksiyon Yöntemi	Toplam Fenol İçeriği (mg GAE/g ekstre)
Ultrasonik 30°C	302.94
Ultrasonik 60°C	170.22
Manyetik karıştırma 30°C	143.75
Manyetik karıştırma 60°C	197.84
Mikrodalga 30°C	117.28
Mikrodalga 60°C	149.50

Toplam fenol içeriklerinin hesaplanması ile Tablo 13’ te görüldüğü üzere, en yüksek fenolik içerik 30 °C’ de gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyonda bulunmuştur. Maserasyon işlemleri ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonrası elde edilen fenol içerikleri, genellikle bizim elde ettiğimiz değerlerden oldukça düşüktür. Bölgesel olarak içerikler değişiklik gösterse de 99-300 mg GAE/ g ekstre aralığındadır (Nedji vd., 2014, Socha vd., 2014, Kumazawa vd. 2004). Seçmiş olduğumuz ekstraksiyon yöntemi olan 100 W’ da 30 dakika süre ile 30 °C’ de gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstrenin toplam fenol içeriği literatürdeki verilere kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu da

seçtiğimiz yöntemin yüksek verimin yanında, yüksek fenolik içerik sağladığını göstermektedir.

7.2.2. Toplam Flavanoit İçeriği

Tablo 14.Farklı ekstraksiyon yöntemlerine ait toplam flavanoit içeriği sonuçları

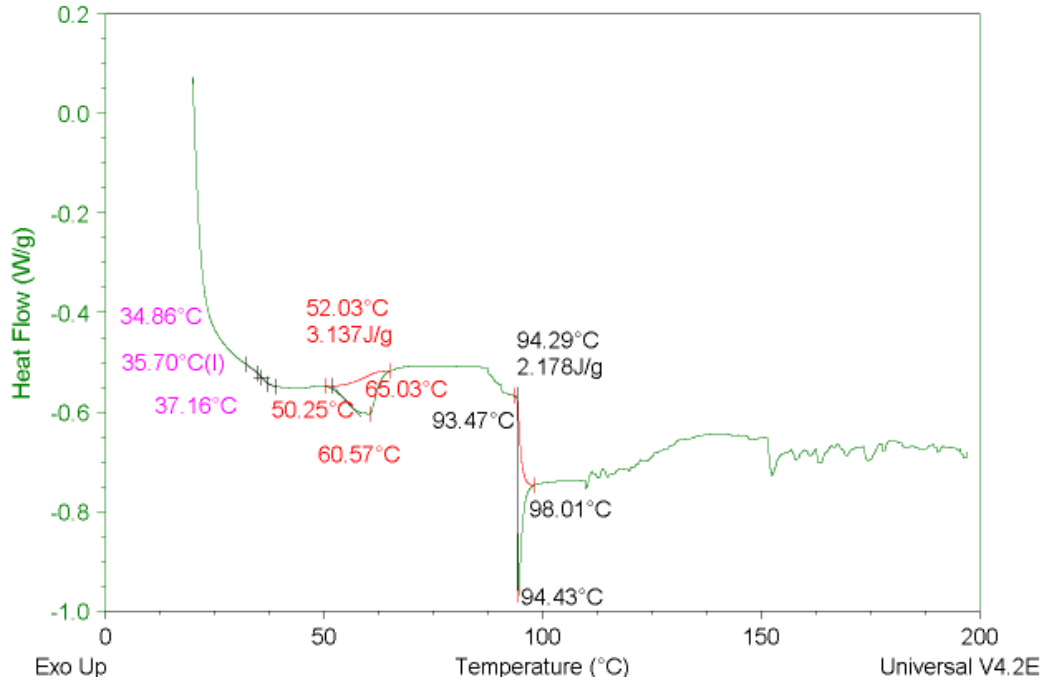
Ekstraksiyon Yöntemi	Toplam Flavanoit İçeriği mg RE/g ekstre
Ultrasonik 30°C	96.7
Ultrasonik 60°C	94.36
Manyetik karıştırma 30°C	92.56
Manyetik karıştırma 60°C	107.43
Mikrodalga 30°C	113.08
Mikrodalga 60°C	93.08

Tablo 14’ de hesaplanan toplam flavanoit içerikleri gösterilmektedir. En yüksek flavanoit içeriği 30 °C’ de gerçekleştirilen mikrodalga ekstraksiyonunda bulunurken, 2.sırada ise 30 °C’ de gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyon yer almaktadır.

Ultrasonik ekstraksiyon, verim, yüksek seçicilik ve kısa ekstraksiyon süresi gereksinimi ile en iyi yöntem olarak seçilmiştir. Bu bulgular Trusheva vd. (2007) yayınıyla da uyum göstermektedir. Ayrıca farklı bölgelerden toplanan propolisin etanol içerisinde 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek elde edilen ekstraktlarına ait flavanoit içeriklerine bakıldığında, 30-180 mg kersetin/ g ekstre aralığında olduğu

görülmektedir (Kumazawa vd., 2004). Bizim analizimiz ise mg rutin/ g ekstre cinsinden olduğundan karşılaştırma yapılamamıştır. Arabistan'dan toplanan propolisin metanol içerisinde 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapılan ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstresine ait flavanoid içeriği ise 16.96 ± 1.48 mg rutin/g ekstre olarak bulunmuştur (Osman vd., 2013). Bu verilere göre, bölgesel içerik ve solvent farklılığı nedeniyle ekstremizin flavanoit içeriği daha yüksek bulunmuştur. Tüm bu analizler ışığında, 30 °C' de gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyon örneği, bundan sonraki tüm analizler de kullanılmıştır.

7.3. Propolisin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi ile Analizinin Sonuçları (DSC)



Şekil 16: Propolis ekstresine ait diferansiyel tarama kalorimetrisi

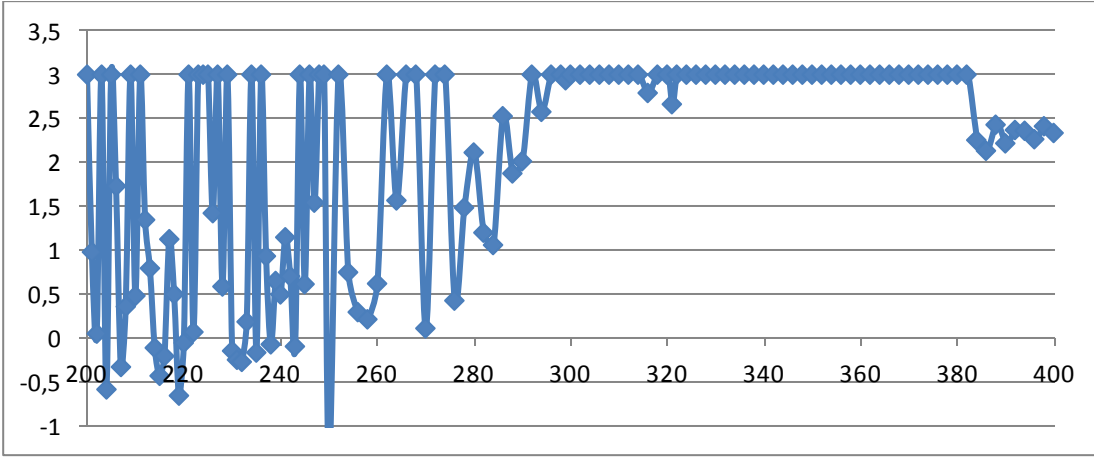
Propolis ekstresine ait termal karakteristik Şekil 16' da verilmiştir. 93,47 °C de keskin bir endotermik pik gözlenmektedir. Propolis 150 °C' nin üzerinde bozunmaktadır.

Literatürde propolis etanol ekstresine ait erime noktası 82.3 °C verilmiştir (Carmen Luiza, 2010). Fakat bölgesel olarak değişim gerçekleşeceği ve erime

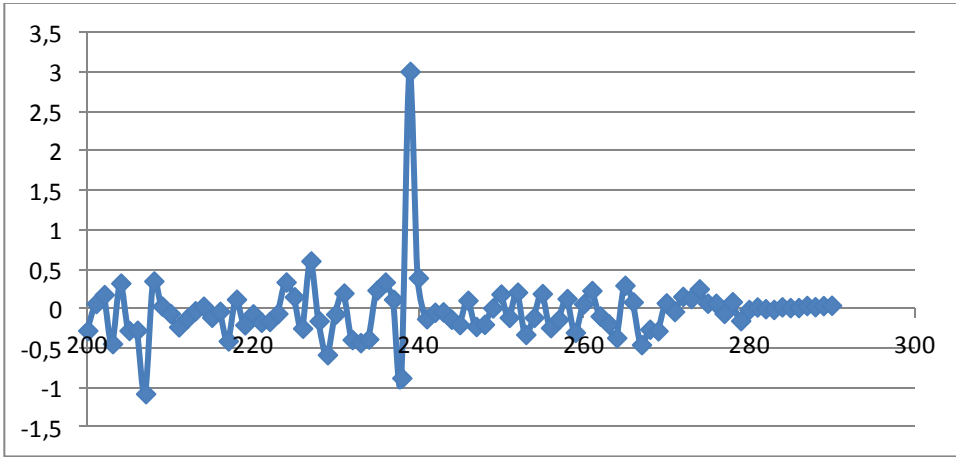
noktalarının 60- 100 °C aralığında olabileceği bilgisine dayanarak, analizin bu değer ile uyduğu söylenebilir (Krell, 1996).

7.4. Propolisin UV spektrofotometrisi ile Analizinin Sonuçları

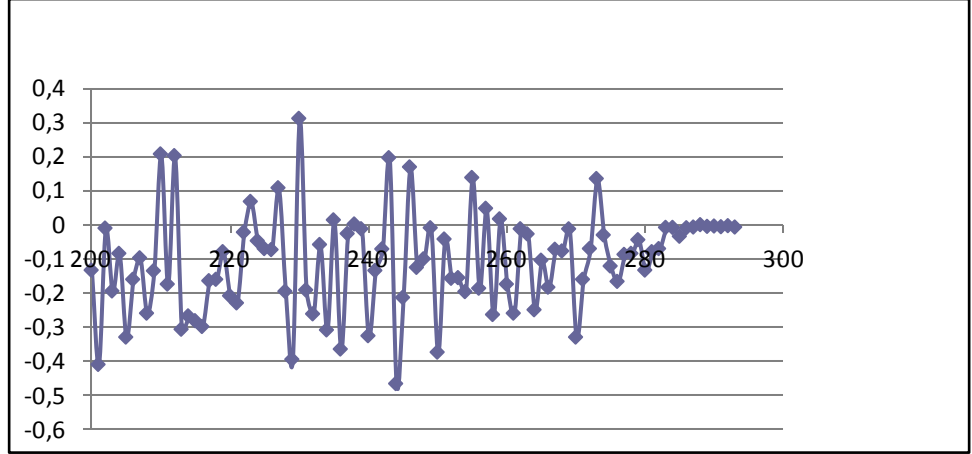
0.05 mg/ml propolis için elde edilen spektrum Şekil 17’de, 0.03 mg/ml propolis için elde edilen spektrum Şekil 18’de, 0.02 mg/ml propolis için elde edilen spektrum Şekil 19’da gösterildiği gibidir.



Şekil 17. 0.05 mg/ml propolis için elde edilen spektrum



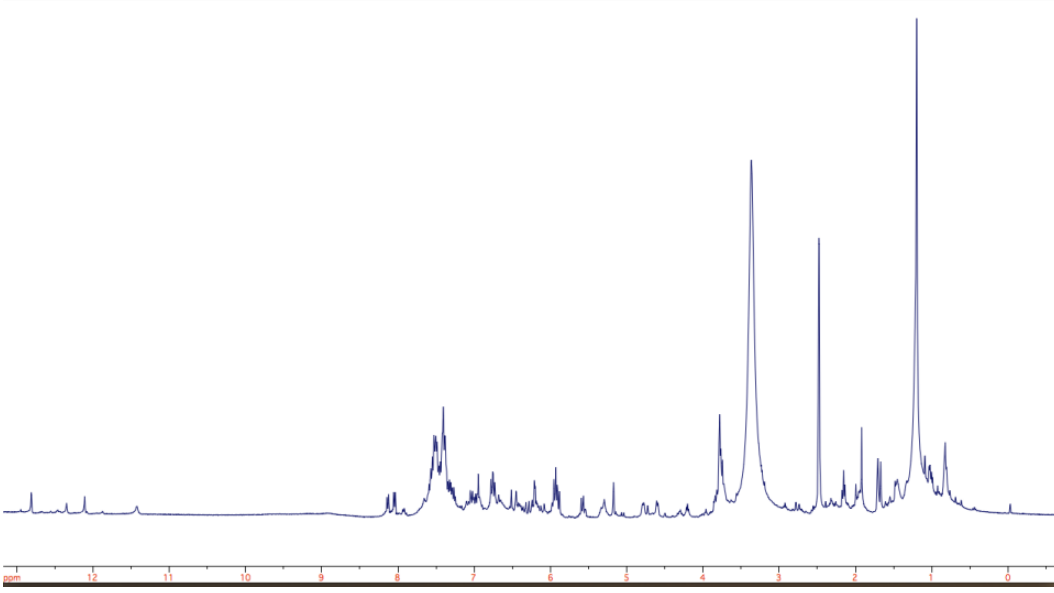
Şekil 18. 0.03 mg/ml propolis için elde edilen spektrum



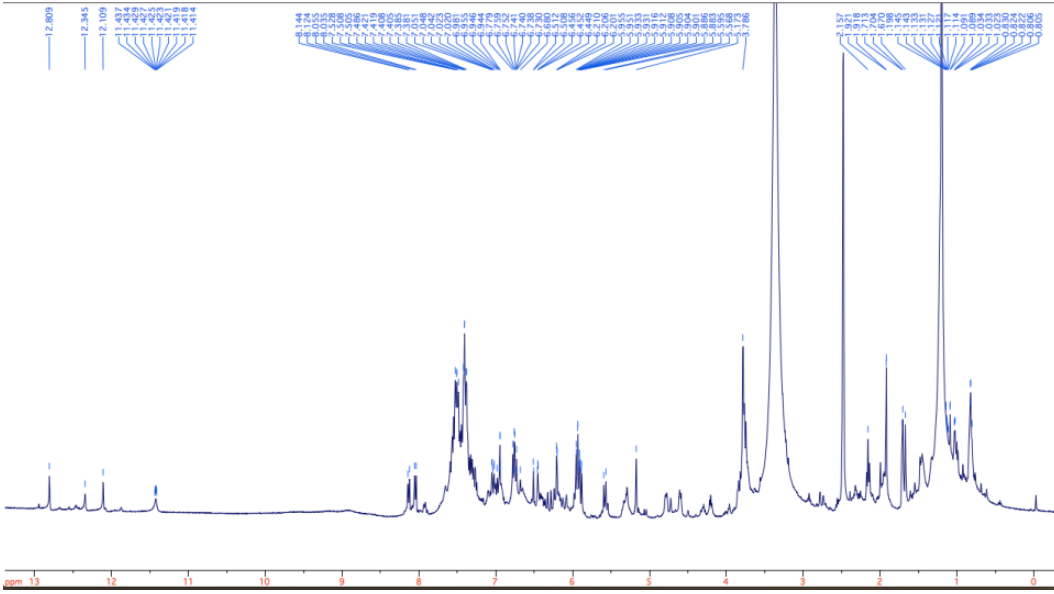
Şekil 19. 0.02 mg/ml propolis için elde edilen spektrum

Literatürde genel olarak 270 ve 330 ila 365 nm aralığında flavonlar ve flavanoller, 290 nm de flavanonlar, 235 ya da 260 nm de izoflavonlar, 340 ila 360 nm aralığında kalkonlar, 280 nm de dihidrokalkonlar, 502 ya da 520 nm de antosiyaninler, 210 ya da 280 nm de ise kateşinler bulunduğu belirtilmektedir (Taylor ve Francis Grubu, 2006). Fakat deneme süresince propolisin konsantrasyonu değişikçe, maksimum absorbans verdiği dalga boyu değeri kaymaktadır ve maksimum pik verdiği dalga boyu değeri ve bileşenin türü tespit edilememektedir. Bu durumda propolisin kompleks yapısının UV spektrum ile belirlenmesi uygun olmadığından, UPLC yöntemi ile çalışmalara devam edilmiştir.

7.5. Propolisin $^1\text{H-NMR}$ Analizinin Sonuçları



Şekil 20: Propolis ekstresine ait $^1\text{H-NMR}$ s pektrumu



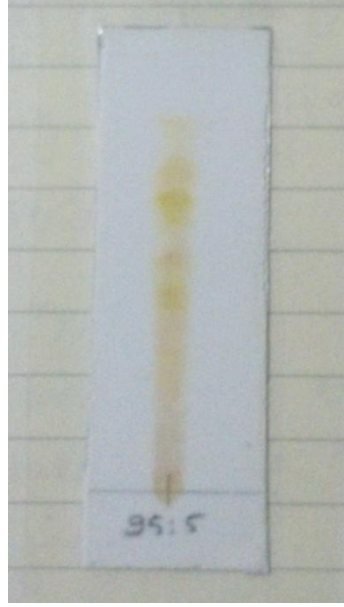
Şekil 21: Propolis ekstresine ait $^1\text{H-NMR}$ s pektrumu

UV spektrumunda görülen durumun benzeri Şekil 20 ve 21’ de verilen $^1\text{H-NMR}$ sonucunda da görülmektedir. Propolis, içeriğinde birçok moleköl barındıran kompleks bir doğal üründür. Bu şekilde içeriğini belirlemek oldukça güçtür. Propolisin toplandığı coğrafyaya göre içeriğinde değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Literatürde Türkiye’den toplanan propolis örneği üzerinde

gerçekleştirilmiş bir $^1\text{H-NMR}$ çalışmasına rastlanamamıştır. Bu nedenle karşılaştırma yapılamamıştır.

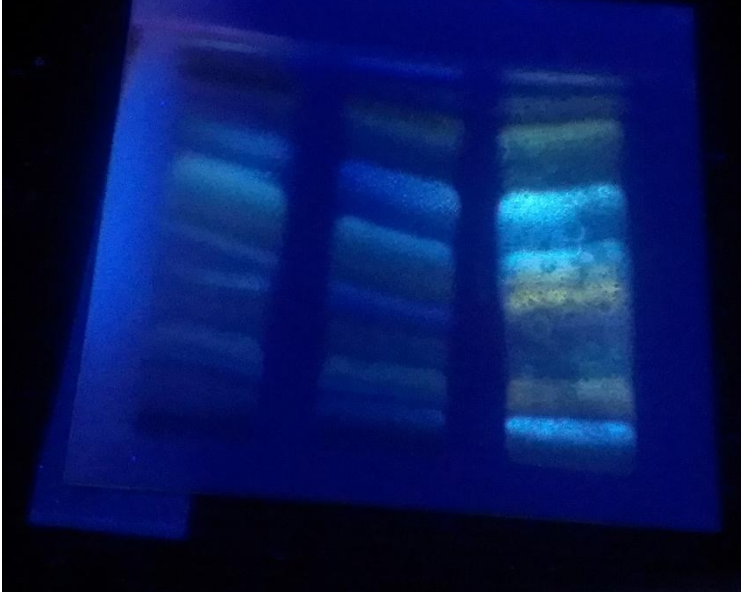
7.6. Propolisin İçeriğindeki Major Bileşenin İzolasyonuna ait Sonuçlar

Seçilen solvent sistemi olan 95:5 diklorometan: metanol ile yapılan yürütme sonrası NP/PEG reagent püskürtmesiyle elde edilmiş İTK Şekil 22' de gösterilmektedir.

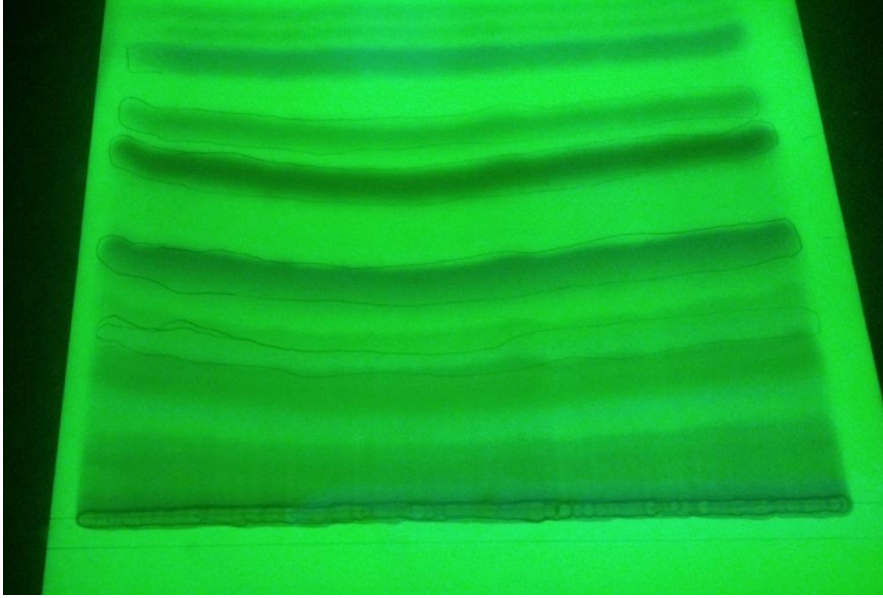


Şekil 22: 95:5 diklorometan:metanol solvent sisteminde yürütülen propolis ekstresine ait İTK

Major bileşenleri belirlemek üzere Cam YPİTK plaka üzerine yapılan uygulama sonrası 95:5 solvent sisteminde yürütülen İTK, Şekil 23' de gösterilmektedir. Bu haliyle majoriteyi belirlemek zor olduğundan, preparatif İTK işlemine geçilmiştir.

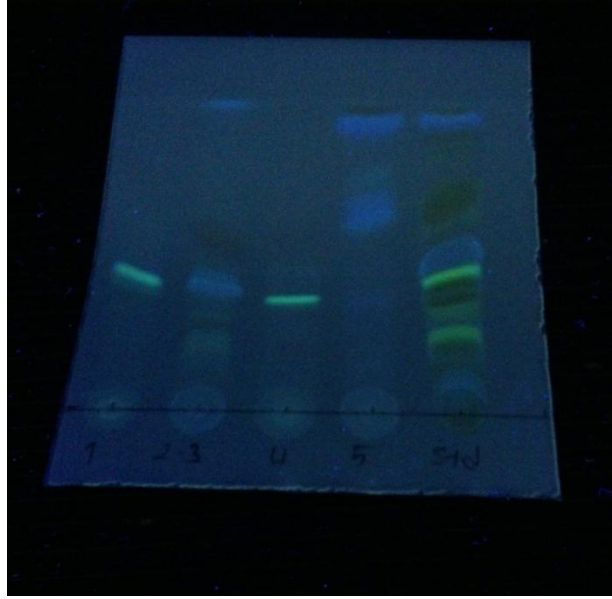


Şekil 23: Propolis ekstresine ait YP-İTK

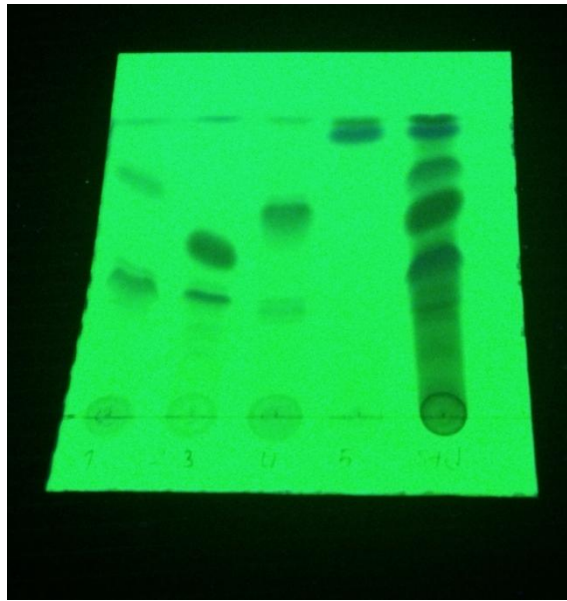


Şekil 24: Propolis ekstresine ait Prep-İTK

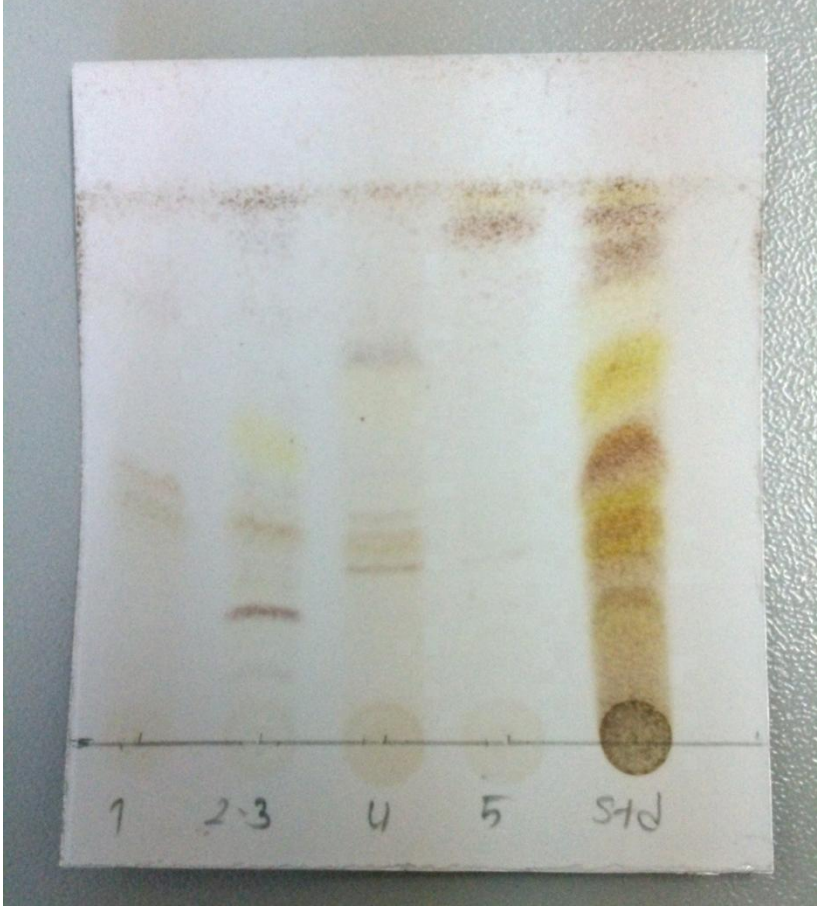
Propolis ekstresi, çizgi halinde 5 adet preparatif İTK plağına uygulanmış ve 95: 5 solvent sisteminde yürütülmüştür. Şekil 24' de gösterilen Prep-İTK plağında aşağıdan yukarıya doğru bantlar 1, 2, 3, 4, 5 olarak numaralandırılmıştır. 2 ve 3 numaralı bantlar birleştirilmiştir. Ardından yapılan İTK analizinin farklı dalga boylarında ve asit muamelesi ile elde edilen görüntüleri Şekil 25-27' de gösterilmektedir.



Şekil 25: Prep-İTK dan kesilen bantlar (366 nm)

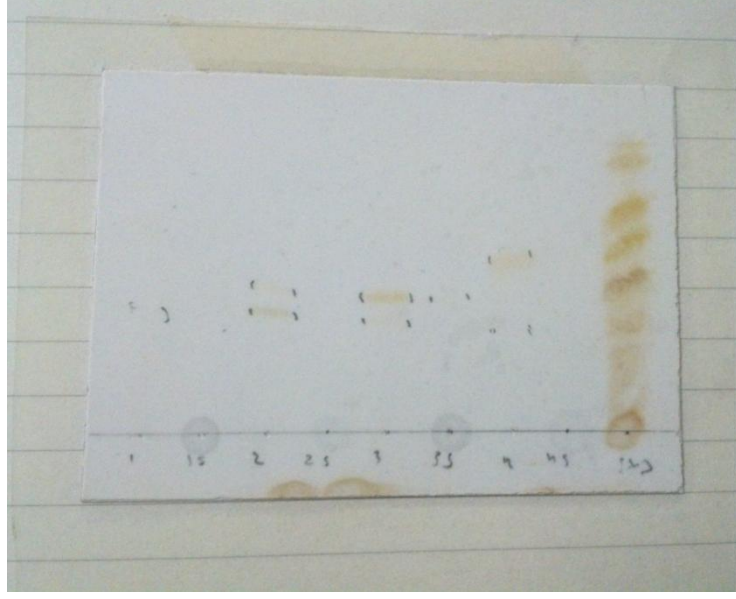


Şekil 26: Prep-İTK dan kesilen bantlar (254 nm)



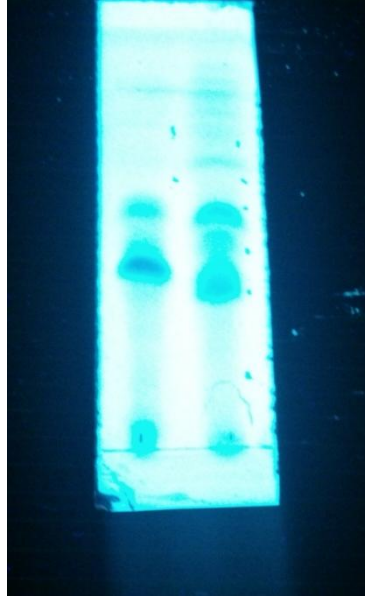
Şekil 27: Prep-İTK dan kesilen bantlar (Asit muamelesi sonrası)

2-3 kodlu örnek ile kurulan poliamid kolondan aralıklarla alınan örneklere ait İTK Şekil 28' de verildiği gibidir.



Şekil 28: Poliamid kolondan toplanan örneklere ait İTK analizi

Poliamid kolonda istenen ayırım sağlanamamıştır. Hala çift bant gözlenmektedir. RP kolon kurulmasına karar verilmiştir. RP kolonun çalışıp çalışmayacağını görmek adına RP tabakada yapılan İTK Şekil 29’ da yer almaktadır.



Şekil 29: RP kolona verilen örnek

RP kolondan alınan örnek hala tam olarak saf görülemediğinden partiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Partiyon sonucu, apolar bileşenlerin alt fazda, polar

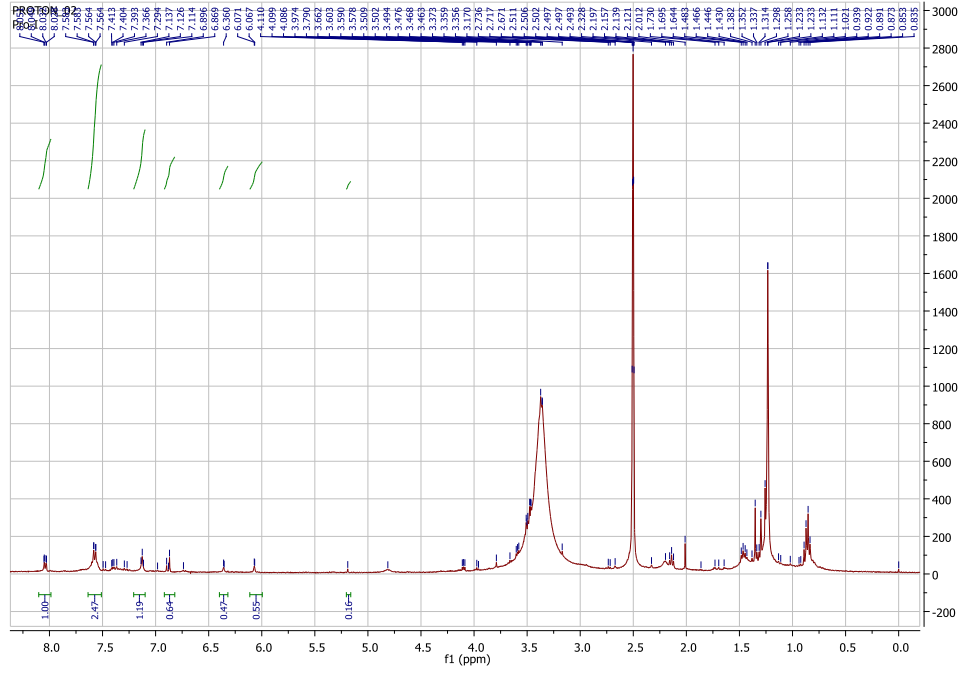
bileşenlerin ise üst fazda kalması beklenmektedir. Alt faz olan diklorometan fazına geçen moleküllerin İTK analizi Şekil 30' da gösterildiği gibidir.



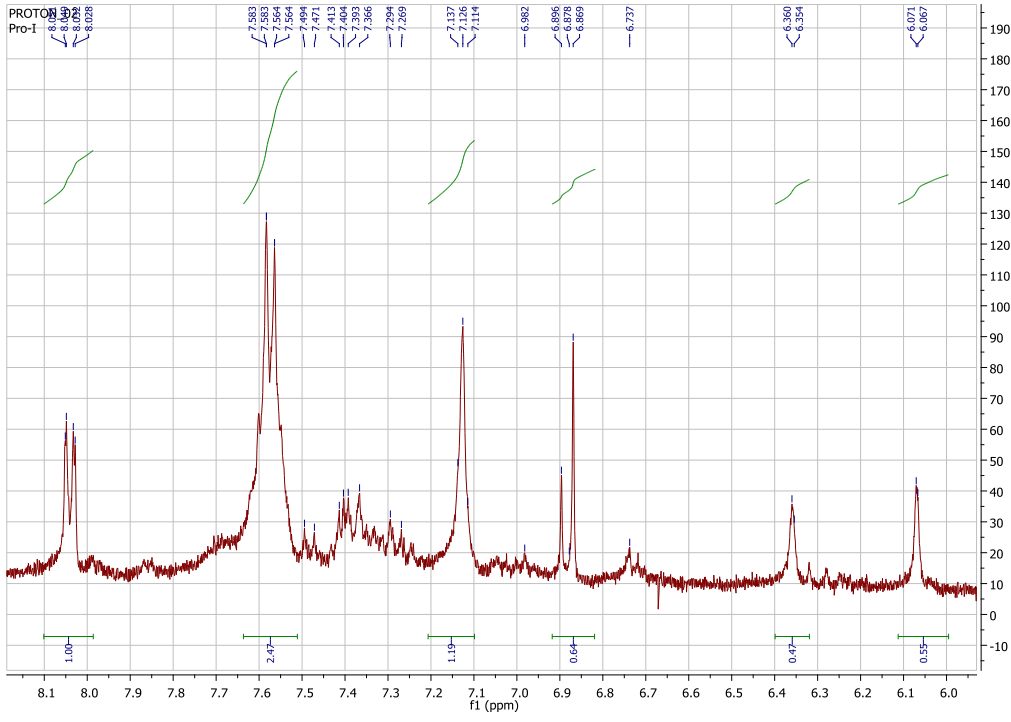
Şekil 30: RP kolondan alınıp partiyon yapılan örnek

7.7. İzole Edilen Bileşenin Karakterizasyonu

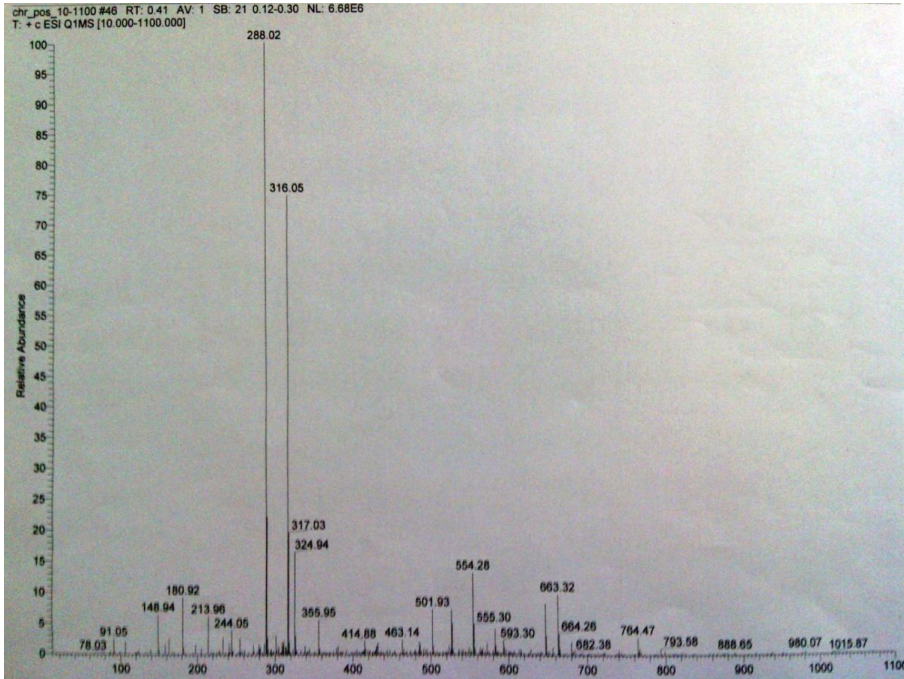
7.7.1. $^1\text{H-NMR}$ ve LC-ESI-MS



Şekil 31: İzole edilen örneğe ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (0-8 ppm)



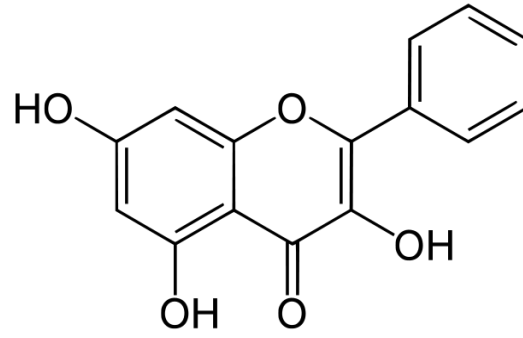
Şekil 32: İzole edilen örneğe ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (6-8.1 ppm)



Şekil 33: İzole edilen molekülden pozitif moda çekilen LC-ESI-MS analizi

Şekil 31-32' de gösterilen $^1\text{H-NMR}$ verileri ile izole edilen molekülün hangi molekül yapısını tayin edebilmek için literatürden yararlanılmıştır. Bertelli vd., (2011) yayını ile yapılan karşılaştırmalar sonucu molekülümüzün galangin olduğu kanaatine varılmıştır. Nitekim LC-ESI-MS'de pozitif modda gözlenen $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ moleküler pik, bileşiğin yapısını doğrulamıştır (Şekil 33).

Galangine ait kimyasal formül ise Şekil 34' de gösterilmiştir.



Şekil 34:Galangin molekülü

7.7.2. UPLC Yöntemi

❖ Geliştirilen UPLC Yöntemine ait Dedeksiyon Sınırı ve Kantitatif Ölçme Sınırının Hesaplanması

Kullanılan UPLC yöntemine ait dedeksiyon ve kantitatif ölçme sınırları hesaplanmıştır.

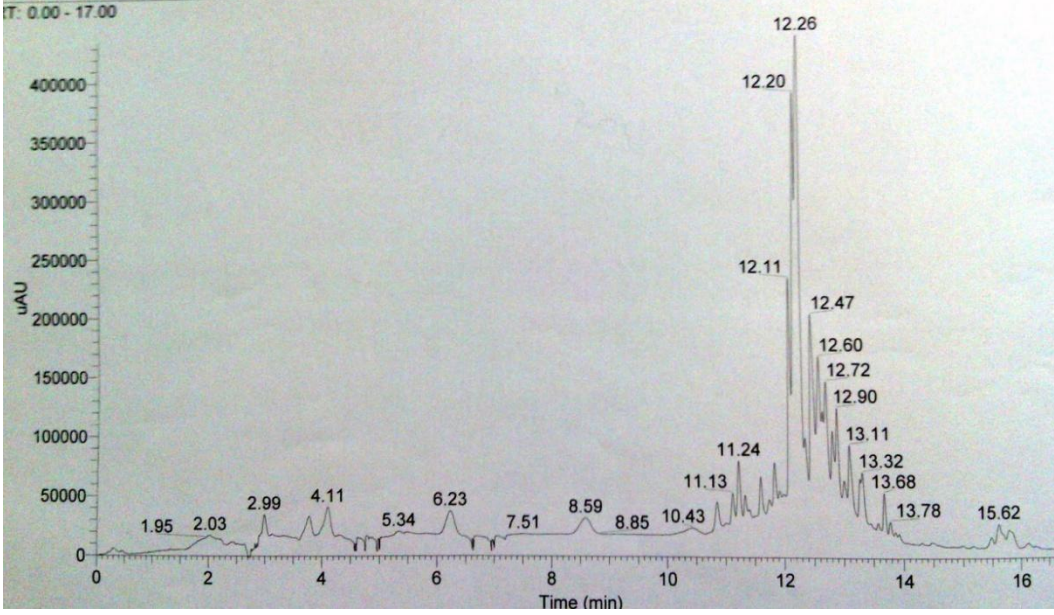
Dedeksiyon sınırı (LOD)= 0.476 ppm

Kantitatif ölçme sınırı (LOQ)=1.587 ppm

Hesaplanan değerler, Verza vd. (2011) yayınındaki dedeksiyon ve kantitatif ölçme sınırlarıyla uyusmaktadır.

❖ Propolisin UPLC Yöntemi ile Analizinin Sonucu

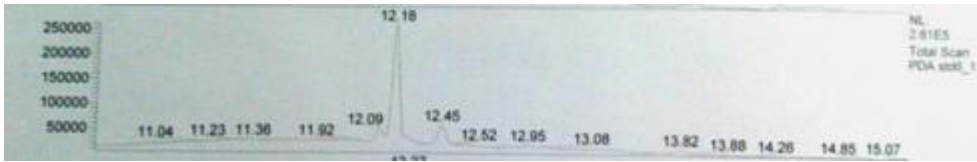
Şekil 35’ de gösterilen analiz sonucuna göre, 12.26 ve 12.20 retensiyon zamanına sahip moleküller ekstre içerisinde konsantrasyonu major olan bileşenlerdir.



Şekil 35: Propolis Ekstresinin Seçmiş olduğumuz UPLC yöntemi ile analizi

❖ Galangin için UPLC den elde edilen kromatogram

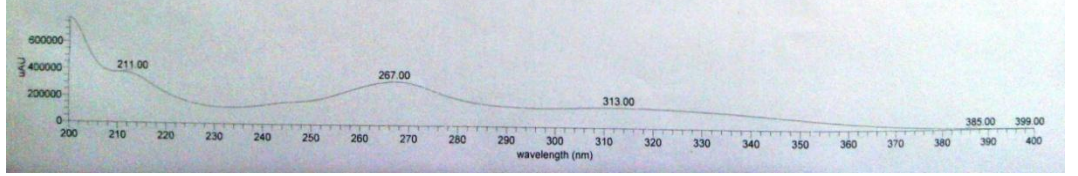
Galangin standardı ile yapılan UPLC analizi ile elde edilen kromatogram, Şekil 36’ da gösterilmektedir. Galangin, 12.18 dk’ da pik vermektedir.



Şekil 36: Galangin standardına (10 ppm) ait UPLC kromatogramı

❖ Galangin'e ait UV spektrumu

UPLC-DAD dedektörü ile galangine ait elde edilen UV spektrum Şekil 37' de gösterilmektedir. Galangin, 211 nm, 267 nm ve 313 nm' de maksimum pik vermektedir. Bu aralık Verza vd. (2011) yayını ile de örtüşmektedir.



Şekil 37: Galangine ait UV spektrum

7.8. Formülasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

7.7.3. Etkin Maddeyi İçermeyen Niozomlara Ait Partikül Boyutları

Hazırlanan niozom formülasyonlarına ait partikül boyutları Tablo 15' de gösterilmiştir.

Tablo 15. Deney deseni ile üretilen partiküllerin boyutları (nm)

Factor 1 A: Surfactant ratio %	Factor 2 B: Time min	Factor 3 C: Temperature C	Response 1 Size nm
0.00	30.00	50.00	721.6
5.00	60.00	40.00	173.9
5.00	45.00	50.00	143.23
10.00	60.00	50.00	172.97
5.00	45.00	50.00	192.83
5.00	30.00	60.00	249.93
10.00	45.00	60.00	227.9
0.00	45.00	60.00	191.33
0.00	45.00	40.00	322.4
10.00	30.00	50.00	216.47
5.00	30.00	40.00	170.9
0.00	60.00	50.00	649.8
5.00	60.00	60.00	206.63
5.00	45.00	50.00	133.1
10.00	45.00	40.00	200.3

7.7.4. Anova Testi

Parametrelerin birbirleriyle ilişkileri ve toplamda prosese olan etkilerinin belirlenebilmesi için grup içi ya da gruplar arası varyans analizlerinin yapılmasında kullanılan ANOVA testi yönteminden yararlanılmıştır.

ANOVA testi için kübik model uygulanmıştır.

A= Surfaktan oranı

B= Zaman

C= Sıcaklık parametrelerini temsil etmektedir.

Cevap olarak ise partikül boyutu (nm) kullanılmaktadır.

Tablo 16.Anova Testinde yer alan parametrelerin birbirleriyle ilişkileri, kareler ortalamaları, f değeri, p değeri

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Kareler ortalaması	F değeri	p değeri
Model	4.378E+0.05	12	36486.86	35.71	0.0276
A	1828.85	1	1828.85	1.79	0.3128
B	406.02	1	406.02	0.40	0.5929
C	3122.57	1	3122.57	3.06	0.2225
AB	200.22	1	200.22	0.20	0.7013
AC	6294.04	1	6294.04	6.16	0.1311
BC	535.92	1	535.92	0.52	0.5442
A²	93913.11	1	93913.11	91.91	0.0107
B²	57085.07	1	57085.07	55.87	0.0174
C²	23860.00	1	23860.00	23.35	0.0403
ABC	0.000	0			
A²B	703.13	1	703.13	0.69	0.4940
A²C	5790.49	1	5790.49	5.67	0.1403
AB²	1.004E+005	1	1.004E+005	98.31	0.0100
AC²	0.000	0			
B²C	0.000	0			
BC²	0.000	0			
A³	0.000	0			
B³	0.000	0			
C³	0.000	0			
Saf hata	2043.48	2	1021.74		
Toplam	4.399E+005	14			

Tablo 16' da modelde $p < 0.05$ olduğundan hipotez reddedilmiştir. Model istatistiksel olarak anlamlıdır. Parametrelere tek tek bakıldığında ise, A^2 , B^2 , C^2 ve $A*B^2$ terimleri istatistiksel olarak anlamlı terimlerdir. Terimlerin birbirleriyle olan ikili parametreleri ise istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 15' de verilen değerler ile GraphPad Prism programında tek yönlü ANOVA testi (Tukey 'in çoklu karşılaştırma testi) yapıldığında ise, $p < 0.0001$ olarak bulunmuştur. Modele ait;

$$F = 26.2$$

$$R^2=0.5840 \text{ dir.}$$

Tablo 17.Tukey'in çoklu karşılaştırma testi

Parametreler	P<0.01
Surfaktan oranı vs Sıcaklık	Hayır
Surfaktan vs Zaman	Hayır
Surfaktan oranı vs Partikül boyutu	Evet
Sıcaklık vs Zaman	Hayır
Sıcaklık vs Partikül Boyutu	Evet
Zaman vs Partikül Boyutu	Evet

Tablo 17' de görüldüğü üzere sonifikasyon süresi, surfaktan oranı ve evaporasyon sıcaklığı parametreleri partikül boyutu üzerinde ayrı ayrı etkili parametrelerdir. Fakat birbirlerini etkilememektedirler. Bu bulgu Jadon vd., 2009, Ruckmani vd., 2010, Rangasamy vd., 2008 yayınlarındaki literatür verileriyle de uyuşmaktadır.

7.7.5. Matematiksel Denklem

Model analizi sonucu elde edilen matematiksel denklem şu şekildedir.

$$\begin{aligned}
 Boyut = & +156.39 - 21.38 * A - 10.08 * B + 27.94 * C + 7.08 * A * B \\
 & + 39.67 * A * C - 11.58 * B * C + 159.48 * A^2 + 124.34 * B^2 \\
 & - 80.39 * C^2 - 18.75 * A^2 * B - 53.81 * A^2 * C - 224.11 * A \\
 & * B^2
 \end{aligned}$$

$$R^2 = 0,9954$$

7.7.6. Niozom Oluşturmak İçin Seçilen Formülasyon

Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Surfactant ratio	is in range	0	10	1	1	3
Time	is in range	30	60	1	1	3
Temperature	is in range	40	60	1	1	3
Size	minimize	133.1	721.6	1	1	3

Solutions

Number	Surfactant ratio	Time	Temperature	Size	Desirability	
1	7.03	31.97	41.87	118.182	1.000	
2	5.26	47.35	58.58	121.803	1.000	
3	4.18	38.98	42.12	125.405	1.000	
4	4.88	49.76	41.62	90.9332	1.000	
5	<u>5.61</u>	<u>49.64</u>	<u>40.62</u>	<u>65.2417</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
6	2.68	45.68	59.80	120.547	1.000	
7	5.81	49.51	59.58	116.669	1.000	
8	6.58	30.12	40.80	117.125	1.000	
9	4.64	48.09	59.45	111.882	1.000	
10	6.79	38.33	43.52	122.333	1.000	
11	4.73	42.79	43.75	114.088	1.000	
12	8.35	36.31	41.83	129.011	1.000	
13	4.47	44.71	40.16	59.8394	1.000	
14	6.40	41.27	59.93	127.229	1.000	

Şekil 38: Programın vermiş olduğu formülasyon değerine ait görüntü

Şekil 38' de görüldüğü gibi, modelde partikül boyutunu minimize eden değerler %5.61 Tween 80 oranı, 41 derece sıcaklık ve 50 dakika sonifikasyon süresi olarak belirlenmiştir.

7.7.7. Partikül Boyutu Ölçümü

Tablo 18.Farklı ilaç yüklemeleri için partikül boyutları ve PDI değerleri

Örnek	Partikül boyutu (nm) \pm SD	Polidispersite İndeksi (PDI)
Boş partikül	153 \pm 2.54	0.169
1 mg/ml propolis yüklü	217.2 \pm 38.32	0.43
3 mg/ml propolis yüklü	270.75 \pm 9.68	0.76
5 mg/ml propolis yüklü	1322.5 \pm 195.86	0.63

Polidispersite indeksi (PDI) değeri, polimerler için moleküler kütle dağılımının bir ölçütüdür. Nanopartiküller için ise partikül boyutu dağılımındaki homojenliğin göstergesidir. 0-1 aralığında değerler alır. PDI değeri büyüdükçe, daha az homojen bir partikül boyutu dağılımı vardır denir (Romero Perez vd., 2009).

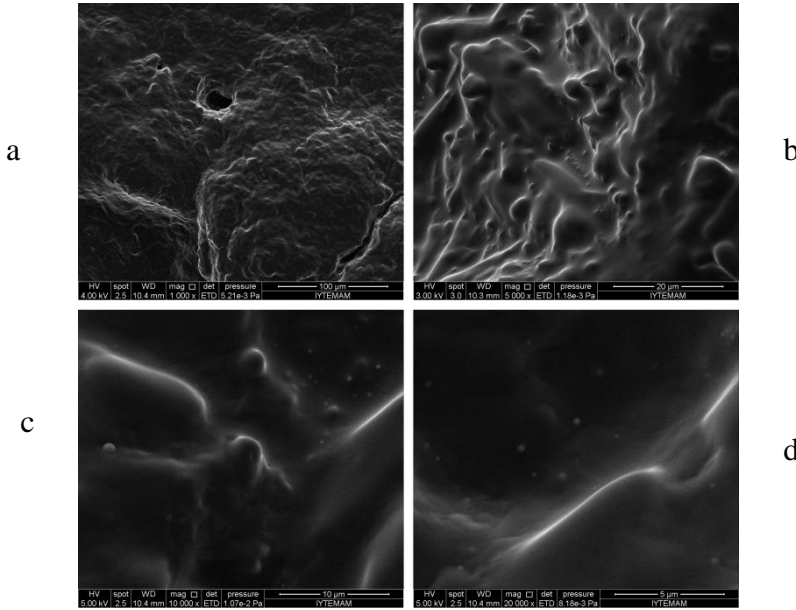
Tablo 18' de gösterilen PDI ve partikül boyutu değerlerine göre, minimum partikül boyutunu veren ve en homojen partikül boyutu dağılımına sahip 1 mg/ml' lik yükleme uygun olarak seçilmiştir.

7.7.8. Seçilen Formülasyon ve İlaç Miktarı ile Üretilen Partiküllerin Karakterizasyonu

7.8.6.1. Partikül Morfolojilerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenme Sonuçları

❖ Etkin Madde İçermeyen Niozom Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntülenme Sonuçları

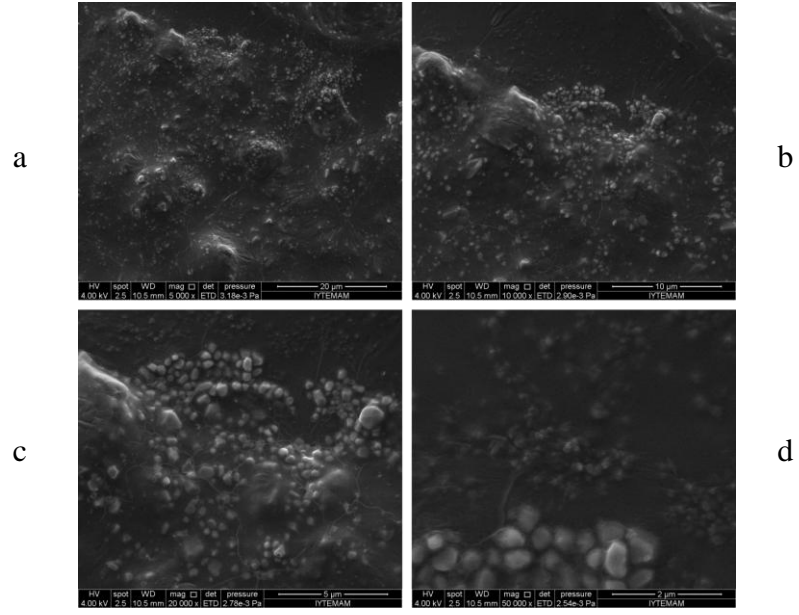
Şekil 39’ da propolis içermeyen niozom formülasyonuna ait fotoğrafları incelendiğinde, niozomların küresel, küçük boyutta ve birbirinden bağımsız halde olduğu görülmektedir.



Şekil 39: Propolis içermeyen niozom formülasyonuna ait SEM görüntüleri a) 1000x, b) 5000x, c) 10000x, d) 20000x büyütme

❖ Propolis İçeren Niozom Formülasyonuna ait Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntülenme Sonuçları

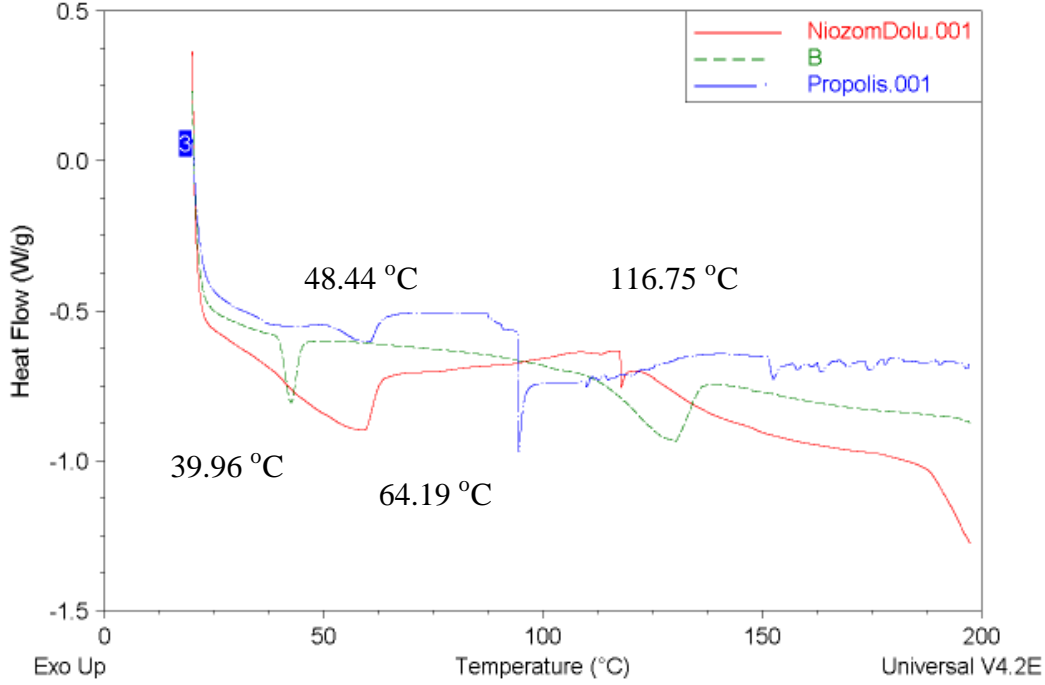
Şekil 40' daki SEM fotoğrafları incelendiğinde, propolis içeren niozomların küresellikleri bozulmuş ve tübüler bir halde, birarada durdukları görülmektedir.



Şekil 40: Dolu Partiküllere ait SEM görüntüleri a) 5000x, b) 10000x, c) 20000x, d) 50000 x büyütme

Propolis içeren ve içermeyen formülasyonlara ait SEM görüntüleri, Satyavathi vd. (2012) ve Kamboj vd. (2014) yayınlarında SEM görüntüleri verilen niozomlar ile uyumluluk göstermektedir.

7.8.6.2. Seçilen Formülasyon ile Elde Edilen Propolis İçeren ve İçermeyen Niozom Formülasyonunun Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi



Şekil 41: Propolis ekstresi, propolis içeren ve içermeyen niozom formülasyonuna ait DSC analizi

Şekil 41’ de görülen, propolis içeren, propolis içermeyen niozom formülasyonundan elde edilen DSC sonuçlarına göre propolis içermeyen partikül 39.96 °C ile 48.44 °C arasında ve 113.23 °C ile 137.25 °C arasında endotermik pikler vermektedir. Propolis içeren partikül ise 38.14 °C ve 64.19 °C arasında ve 116.75 °C’ de endotermik pik vermektedir. Bu durumda etkin madde niozom içerisinde amorf haldedir denilebilir. Etkin maddeye ait 93.47 °C’ deki keskin endotermik pik, propolis içeren niozom formülasyonunda gözlenmemektedir.

7.7.9. Yükleme Verimi

1.73 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan propolis ekstresi 1:10 oranında seyreltildiğinde içerisinde 15.8 mg/L' lik galangin tespit edilmiştir. Belirlenmiş formülasyon ve propolis miktarı ile hazırlanmış niozomlardan santrifüj ile ayrılan süpernatanttan ölçülen galangin miktarı ise 3.038 mg/L olarak bulunmuştur. Niozom formülasyonuna yüklenen ekstrenin konsantrasyonu 1 mg/ml şeklindedir. Ekstremizin içerdiği galangin miktarı üzerinden gidilerek, yükleme verimi hesaplanmıştır.

Yükleme verimi:

$$((0.158/1.73) \text{ mg/ml} - 0.03038 \text{ mg/ml}) / (0.158/1.73) \text{ mg/ml} * 100 = \% 64.67$$
olarak hesaplanır.

Literatür ile karşılaştırıldığında Span grubu surfaktanlar ile hazırlanan niozomlara ait yükleme verimleri %44-%96 aralığındadır (Srinivas vd., 2010, Jadon vd., 2009). Tween grubu surfaktanlar ile hazırlanan niozomlara ait yükleme verimleri ise %18-%90 aralığında değişmektedir, Tween 80 ile hazırlanan formülasyonlarda bu aralık %53-%61 şeklindedir (Sathali vd., 2010). Bu bilgiler ışığında elde etmiş olduğumuz yaklaşık %65'lik yükleme verimi başarılı kabul edilebilir.

8. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

8.1. Genel Sonuçlar

Bu çalışma propolis içeren niozomların hazırlanması, formülasyon parametrelerinin ve etkin madde salımının değerlendirilmesine yöneliktir. Yapılan kaynak taramalarında propolise ait niozom kullanımına ve Türkiye’den toplanan propolise ait bir izolasyon çalışmasına da rastlanılmamıştır. Ayrıca propolisin daha çok etanol ekstresi olarak kozmetik, ilaç sanayi ve gıda sektöründe kullanımı söz konusu olup, kontrollü salım sistemlerindeki uygulamaları da oldukça kısıtlıdır. Propolis suda çözünürlüğü çok düşük olan bir doğal üründür ve etanol ekstresi de yoğun kokusu ve hoş olmayan tadı nedeniyle etkin olarak kullanılamamaktadır. Bu nedenle niozomal veziküllerin içine yüklenmesi ile kullanım kolaylığı yaratma, vücut sıvılarındaki çözünürlüğünün artırılması ve dolayısıyla biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonuçları aşağıda verilmiştir;

- ✓ Propolis yapışkan olması nedeniyle ekstre edilmeden kullanılacak bir madde değildir. Ekstraksiyon için çözücü olarak genellikle metanol ya da etanol tercih edilmektedir. Metanolün toksik etkileri nedeniyle kullanılması tercih edilmediğinden, çözücü %96 saflıkta etanoldür. Propolis üç farklı ekstraksiyon yöntemi ve iki farklı sıcaklık deneyerek ekstre edilmiş, verim analizine göre en uygun ekstraksiyon yönteminin 30°C de 30 dakika süre ile ultrasonik ekstraksiyon olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Ekstrelerin toplam fenol ve flavanoit içerikleri hesaplanmıştır. 302.94 mg GAE/g ekstre değeri ile en yüksek fenolik içeriğe 30 °C de 30 dakika süre ile ultrasonik ekstraksiyonunda, 113.08 mg RE/ g ekstre değeri ile en yüksek flavanoit içeriğe ise 30°C de 15 dakika süre ile mikrodalga ekstraksiyonunda rastlanmıştır.
- ✓ Propolis ekstresinden elde edilen DSC termogramı etkin maddenin 94°C de erimeye başladığını, 150°C’ den sonra da bozunmaya başladığını göstermektedir.

- ✓ Çekilen UV spektrumu üzerinden propolisin kompleks yapısı nedeniyle değerlendirilmesinin güç olduğu görülmüş ve UPLC yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir.
- ✓ Propolis ekstresine ait ¹H-NMR spektrumuna bakılarak, zengin içeriği nedeni ile kompozisyonunu belirlemek oldukça güçtür.
- ✓ Propolis içerisindeki major bileşen izole edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla YPİTK yapılmış fakat major bileşen belirlenemediğinden Prep-İTK ye geçilmiştir.
- ✓ Prep-İTK üzerinde ekstre içerisindeki maddeler yürütülmüş, tabakadan bantlar kesilmiş ve metanolde bekletilmiştir. Ardından poliamid ve RP (karşıt faz C18) kolon kromatografileri uygulanmış, devamında partiyon işlemi yapılmıştır.
- ✓ Elde edilen izolatin ¹H-NMR analizi yapılmış, LC-ESI-MS ile desteklendiğinde ise molekülün galangin olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Galangine ait UPLC tekniği geliştirilmiş, ardından 0.5-25 ppm aralığında değerler için hazırlanan stok çözeltilerle bir kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Kantitatif ölçüm sınırı 1.58 ppm olarak belirlenmiştir.
- ✓ 1 mg/ml propolis ekstresi içerisinde 0.086 mg/ml galangin tespit edilmiştir.
- ✓ Niozom oluşturmak için uygulama kolaylığı ve işlem süresinin kısalığı nedeniyle eter enjeksiyonu yöntemi tercih edilmiştir.
- ✓ Formülasyon çalışmaları için Design Expert programı kullanılmış, Box-Behnken Deneysel Deseni oluşturulmuştur. Partikül boyutunu etkileyen parametreler olarak da surfaktan oranı, uçurma sıcaklığı ve sonifikasyon süresi belirlenmiştir.
- ✓ Literatürden yapılan araştırmalara göre niozom üretimi için surfaktan oranı için 1-10, uçurma sıcaklığı için 40-60 °C ve sonifikasyon süresi için de 30-60 dk aralıkları belirlenmiştir.
- ✓ Yapılan etkin madde içermeyen formülasyon çalışmaları sonrasında, üretim sırasında organik çözücü olarak kullanılan eter miktarının 10 mL olmasına karar verilmiştir.
- ✓ Partikül boyutları ölçüldükten sonra modelde partikül boyutunu minimize eden değerler %5.61 Tween 80 oranı, 41 derece sıcaklık ve 50 dakika sonifikasyon süresi olarak belirlenmiştir.

- ✓ Yüklenecek etkin madde miktarı literatürden 10-50 mg aralığında belirlenmiş, yapılan üretimlerden sonra partikül boyutları ölçüldüğünde, 10 mg yükleme partikül boyutunu minimize edecek en uygun miktar olarak saptanmıştır.
- ✓ DSC termogramlarından elde edilen bulgulara göre etkin madde niozom içerisinde amorf halde bulunmaktadır.
- ✓ Üretilen niozom formülasyonlarına ait SEM fotoğrafları incelendiğinde, boş niozomların daha küresel, küçük boyutta ve birbirinden bağımsız halde olduğu görülürken, etkin madde içeren niozom formülasyonlarının küresellikleri bozulmuş, tübüler bir halde, agregate durumda oldukları görülmektedir. Bu durumun formülasyonda HLB' si yüksek olan Tween 80 kullanılması ya da kolesterol miktarının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.
- ✓ Galangine ait standart eğri kullanılarak, hazırlanan formülasyonlarda % EE (etkin madde yükleme etkinliği) değerinin % 65 olduğu hesaplanmıştır.
- ✓ Propolis günümüzde sıklıkla enfeksiyon giderici, bağışıklık artırıcı bir gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Enkapsüle edilerek kullanımına dair son on yılda gelişen çalışmalar mevcut olup, henüz bir niozom çalışmasına rastlanmamıştır. Ayrıca içeriği bölgesel olarak değişiklik gösterdiğinden literatürdeki verileri Türkiye'den toplanan propolise adapte etmek pek mümkün değildir. Türkiye'deki propolise ait içeriğin belirlenmesi üzerine kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. İzolasyon çalışması ise henüz yapılmamıştır. Genellikle içerisinde yer alan ve farmakolojik etkileri bilinen bir bileşeni üzerinde durularak gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları ya da antibakteriyel testler mevcuttur.
- ✓ Bu çalışma Türkiye'den toplanan propolisin ne kadar zengin bir matrisle sahip olduğunun, ileri analiz yöntemleri ile izolasyonunun ve karakterizasyonunun bir doktora tezi kapsamında incelenebileceğinin bir göstergesi olabilir. Hoş olmayan kokusu ve tadı nedeniyle kullanımının kısıtla olmasına rağmen çok zengin bir farmakolojik spektrumu olan propolis, gıda takviyesi olarak kullanımının dışında taşıyıcı sistemler kullanılarak elde edilen ilaç salım sistemlerinde, hücre kültürü çalışmalarında, kanser çalışmalarında da etkin madde olarak rahatlıkla

kullanılabilir. Sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi, *in vivo* çalışmaların yapılması ile birlikte ileride hastalara ilaç olarak verilebilecek bir doğal ürün haline gelebilir.

8.2. Öneriler

- ✓ Niozomları oluştururken eter enjeksiyonu yöntemi kullanıldığından, formülasyonda hala eter bulunmaktadır. Bu da hoş olmayan bir koku bırakmaktadır. Neden olarak, gerekli ölçüde uçurma yapılmamış olması verilebilir. Ayrıca enjeksiyon el ile yapıldığından partikül boyutu dağılımı düzensiz olmaktadır. Daha düzenli bir partikül boyutu dağılımı elde etmek adına enjeksiyon işlemi otomatize edilebilir ya da farklı bir niozom oluşturma yöntemi tercih edilebilir.
- ✓ Niozomlar sıvı halde bulduklarından stabilite problemleri yaşanmaktadır. Bu sorunu çözmek adına ileriki çalışmalarda proniozomların üretimi üzerinde durulabilir.
- ✓ Propolis çok kompleks bir etkin madde olduğundan içeriğinin tam olarak belirlenebilmesi için ileride bir doktora çalışması olarak daha kapsamlı bir izolasyon ve karakterizasyon çalışmasına gidilebilir, içeriğinde belirlenen maddelerin farmakolojik etkinliğine göre ilaç hedefleme sistemleri oluşturulabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Bosch, F., and Rosich, L.,** 2008, The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize, *Review Pharmacology*; 82: 171–179 pp.
- Davis, S.S., and Illum, L.,** 1986, Colloidal Delivery Systems-Opportunities and Challenges, *In: Site Specific Drug Delivery Eds. Tomlinson, E., Davis, S.S.,* John Wiley and Sons Ltd., 93-110 pp.
- Tomlinson, E., and Livingstone, C,** 1989, Selective Drug Delivery and Targeting, *Pharm. J.*, November (1), 619-621 pp.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., and Bannerjee, S., K.,** Jan-Mar 2012, Drug delivery systems: An updated review, *Int J Pharm Investig.* 2(1): 2-11 pp.
- Munin A., and Edwards-Lévy F.,** 2011, Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review, *Pharmaceutics*, 3, 793-829 pp.
- Vadlamudi, H., and C., Sevukarajan, M.,** 2012, Niosomal Drug Delivery System- A Review, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research.*; 2(9), 1193-1213 pp.
- Madhav N., V., S., and Saini A.,** 2011, Niosomes: A Novel Drug Delivery System, *IJRPC*, 1(3), 499-511 pp.
- Nasir, A., Harikumar S., L., and Amanpreet, K.,** 2012, Niosomes: An Excellent Tool For Drug Delivery, *IJRPC*, 2(2), 479-487 pp.
- Srinivas S, Anand kumar Y, Hemanth A, and Anitha M.,** 2010, Preparation and evaluation of niosomes containing aceclofenac., *Dig J Nano Mat and Biostr.*; 3(2): 199-203 pp.
- Fang J., Y., Hong C., T., Chiu W., T., and Wang Y., Y.,** 2001, Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int J Pharm.*; 219: 61–72 pp.
- Jatav, V., S., Singh, S., K., Khatri, P., Sharma, A., K., and Singh, A.,** 2011, Formulation and in-vitro evaluation of Rifampicin-Loaded Niosomes. *J. Chem. Pharm. Res.*; 3(2):199-203 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baillie A., J., Florence A., T., Hume L., R., Muirhead G., T., and Rogerson A.,** 1985, The preparation and properties of niosomes-non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol.*; 37: 863–868 pp.
- Khandare J., N., Madhavi G., and Tamhankar B., M.,** 1994, Niosomes novel drug delivery systems. *The Eastern Pharmacist.*; 37: 61-64 pp.
- Suggy S, Murari C., and Ahmad, R.,** 2004, Niosomes- A review. *Biopharm.*,24-37 pp.
- Singh, G., Dwivedi, H., Saraf, S., K., and Saraf, S., A.,** 2011, Niosomal Delivery of Isoniazid - Development and Characterization. *Tropical J Pharm Res.*; 10 (2): 203-210 pp.
- Mayer L., D., Bally M., B., Hope M., J., and Cullis P., R.,** 1985, *Biochem Biophys Acta.*; 816: 294-302 pp.
- Chauhan S., and Luorence M., J.,** 1989, The Preparation of Polyoxyethylene Containing Non-Ionic Surfactant Vesicles. *J Pharm Pharmacol.*; 41: 46 pp.
- Blazek W., A., I., and Rhodes D., G.,** 2001, SEM Imaging Predicts Quality of Niosomes from Maltodextrin-Based Proniosomes. *Pharm Res.*; 18: 656-661 pp.
- Griffin, William C.,** 1954, "Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants", *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 5 (4): 249-256 pp.
- Davies J., T.,** 1957, "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent", *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface* (Proceedings of the International Congress of Surface Activity): 426–438 pp.
- ICI Americas Inc. Wilmington,** The HLB SYSTEM a time-saving guide to emulsifier selection, Delaware 19897, Erişim tarihi: 26 Temmuz 2014
- Yoshida H., Lehr C., M., Kok W., Junginger H., E., Verhoef J., C., and Bouwstra J., A.,** 1992, Niosomes for oral delivery of peptide drugs. *J Cont Rel.*; 21: 145-154 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shahiwala A., and Misra A.,** 2002, Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. *J Pharm Sci.*; 5: 220-225 pp.
- Ay, O.,** 1991, A Novel Drug Delivery System Nonionic Surfactant Vesicles. *Euro J Pharm Biopharm.*; 37: 75-79 s.
- Bhaskaran S., and Panigrahi L.,** 2002, Formulation and Evaluation of Niosomes using Different Nonionic Surfactant. *Ind J Pharm Sci.*; 64(1): 63-65 pp.
- Stafford S., Baillie A., J., and Florence A., T.,** 1988, Drug effects on the size of chemically defined non-ionic surfactant vesicles. *J Pharm Pharmacol.*; 40: 26 pp.
- Rogerson A., Cummings J., Willmott N., and Florence A.,T.,** 1988, The distribution of doxorubicin in mice following administration in niosomes. *J Pharm Pharmacol.*; 40(5): 337-342 pp.
- Hunter C.,A., Dolan T., F., Coombs G., H., and Baillie A., J.,** 1988, Vesicular systems (niosomes and liposomes) for delivery of sodium stibogluconate in experimental murine visceral leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol.*; 40: 161-165 pp.
- Abhinav, K., Lal, P., J., Amit, J., and Vishwanabhan, S.,** 2011, Review of niosomes as novel drug delivery system. *Int Res J Pharm.*; 2(5): 61-65 pp.
- Balakrishnan P., Shanmugam, S., Lee, W., S., Lee, W., M., Kim, J., O., Oh, D., H., Kim, D., D., Kim, J., S., Yoo, B., K., Choi, H., G., SooWoo, J., and Yong, C., S.,** 2009, Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. *Int J Pharm.*; 377: 1-8 pp.
- Manosroi A.,** 2003, Characterization of Vesicles Prepared with Various Nonionic Surfactants mixed with Cholesterol. *Colloids surf. Biointerfaces.*; 30: 129-138 pp.
- Kreuter J.,** Colloidal Drug Delivery System of Niosome, Dekker series, *Dekker publication.* 66:73 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muzzalupo R., Trombino S., Iemma F., Puoci F., Mesa C., L., and Picci N.,** 2005, Preparation and characterization of bolaform surfactant vesicles. *Colloids Surf B. Biointerfaces.*; 46(2): 78–83 pp.
- Gregoriadis G, and Florence A., T.,** 1993, In Liposome technology. Vol.II. CRC Press, Boca Raton,; 165 p.
- Muller R., H., Radtke M., and Wissing S., A.,** 2002, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv.*; 54: 131-155 pp
- Arumothayanun P., Bernard M., S., Craig D., M., Uchegbu I., F., and Florence, A., T.,** 2000, The effect of processing variables on the physical characteristics of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) formed from a hexadecyl diglycerol ether. *Int J Pharm.*; 201: 7–14 pp.
- Sonia, A., Bharat, P., Hitesh, D., Abhishek, C., and Varun, T.,** 2012, Niosomes: The Unique Vesicular Drug Carriers, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*,; 2(1)
- Azmin M., N., Florence A., T., Handjani V., R., M., Stuart J., F., B., Vanlerberghe G., and Whittaker J., S.,** 1985, The Effect of Non-Ionic Surfactant Vesicle (niosome) Entrapment on the Absorption and Distribution of Methotrexate in Mice. *J Pharm Pharmacol.*; 37: 237–242 pp.
- Chandraprakash K., S., Udupa N., Umadevi P., and Pillai G., K.,** 1992, Formulation and Evaluation of Methotrexate Niosomes. *Ind J Pharm Sci.*; 54(5): 197 pp.
- Chandraprakash K., S., Udupa N., Devi P., U., and Pillai G., K.,** 1993, Effect of niosome encapsulation of methotrexate. Macrophage activation on tissue distribution of methotrexate and tumour size. *Int J Pharm.*; 1: 133-137 pp.
- Udupa N., Chandraprakash K., S., Umadevi P., and Pillai G., K.,** 1993, Formulation and evaluation of methotrexate niosomes. *Drug Dev Ind Pharm.*; 19:1331–42 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lakshmi P., K., Devi, G., S., Bhaskaran, S., and Sacchidanand S.,** 2007, Niosomal methotrexate gel in the treatment of localized psoriasis: Phase I and phase II studies. *Indian J Dermatol Venerol Leprol.*; 73(3): 157-161 pp.
- Baillie A., J., Coombs G., H., and Dolan T., F.,** 1986, Non-ionic surfactant vesicles: niosomes as delivery system for the anti-leishmanial drug as sodium stribogluconate. *J Pharm Pharmacol.*; 38: 502-505 pp.
- Carter K., C., Dolan T., F., Baillie A., J., and MacColgan C.,** 1989, Visceral Leishmaniasis Drug Carrier System Characteristics and the Ability to clear Parasites from the Liver, Spleen and Bone Marrow in Leishmania Donovanii infected BALB/c Mice. *J Pharm Pharmacol.*; 41(2):87-91 pp.
- Rogerson A.,** 1987, Adriamycin-Loaded Niosomes –Drug Entrapment, Stability and Release. *J Microencap.*; 4(4): 321-328 pp.
- Cable C.,** 1989, An examination of the effects of surface modifications on the physicochemical and biological properties of non-ionic surfactant vesicles, Ph.D. Thesis, University of Strathclyde, Glasgow, UK
- Uchegbu I., F., Double J., A., Turton J., A., and Florence A., T.,** 1995, Distribution, metabolism and tumoricidal activity of doxorubicin administered in sorbitan monostearate (Span 60) niosomes in the mouse. *Pharm Res.*; 12:1019 pp.
- Moser P Marchand A., M., Labrude P., Handjani V., R., M., and Vignerson C.,** 1989, Niosomes D'hémoglobine preparation, Proprietes Physicochimiques Et Oxyphoriques, Stabilite. *Pharma Acta Helv.*; 64 (7):192-202 pp.
- Brewer J., M., and Alexander J., A.,** 1992, The Adjuvant Activity of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) on the BALB/c Humoral Response to Bovine Serum Albumin. *Immunology.*; 75(4): 570-575 pp.
- Reddy D., N., and Udupa N.,** 1993, Formulation and Evaluation of Oral and Transdermal Preparation of Flurbiprofen and Piroxicam Incorporated with Different Carriers. *Drug Dev Ind Pharm.*; 19: 843-852 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parthasarathi G., Udupa N., Umadevi P., and Pillai G., K.,** 1994, Niosome Encapsulated of Vincristine Sulfate Improved Anticancer Activity with Reduced Toxicity in Mice. *J Drug Target.*; 2(2): 173-182 pp.
- Raja Naresh R., A., Chandrashekhar G., Pillai G., K., and Udupa N.,** 1994, Antiinflammatory Activity of Niosome Encapsulated Diclofenac Sodium with Tween -85 in Arthritic rats. *Ind J Pharmacol.*; 26: 46-48 pp.
- Hofland H., E., Van der Geest R., Boode H., E., Junginger H., E., and Bouwstra J., A.,** 1994, Estradiol permeation from non-ionic surfactant vesicles through human stratum corneum *in vivo*, *Pharm res.*; 11(5): 659-664 pp.
- Don A., Van H., Joke A., B., and Hans E.,** 1997, Non ionic surfactant vesicles containing estradiol for topical application, Ph.D. thesis
- Jain C., P., and Vyas S., P.,** 1995, Preparation and characterization of niosomes containing rifampicin for lung targeting. *J Microencapsul.*; 12: 401–407 pp.
- Jain C., P., Vyas S., P., and Dixit V., K.,** 2006, Niosomal System for Delivery of Rifampicin to Lymphatics. *Int. J. Pharma Sci.*; 68: 575 – 578 pp.
- Mullaicharam A., R., and Murthy R., S., R.,** 2004, Formulation, optimization and stability of rifampicin niosomes, *The Indian Pharmacist.*; 4: 54-58 pp.
- Jayaraman C., S., Ramachandran C., and Weiner N.,** 1996, Topical Delivery of Erythromycin from Various Formulations an In Vivo Hairless Mouse Study. *J Pharm Sci.*; 85(10): 1082-1084 pp.
- Jigar, V., Puja, V., and Krutika, S.,** 2011, Formulation and evaluation of topical niosomal gel of erythromycin. *Int J Pharm Pharm Sci.*; 3(1): 123-126 pp.
- Perini G., Saettone M., F., Carafa M., Santucci E., and Alhaique F.,** 1996, Niosome as carrier for ophthalmic drugs-in vitro/in vivo evaluation, *Boll Chim Farm.*; 135(2): 145-146 pp.
- Naresh R., A., R.,** 1996, Kinetics and Tissue Distribution of Niosomal Bleomycin in Tumor Bearing Mice. *Ind J Pharm Sci.*; 58: 230 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Souza D., S., Ray J., Pandey S., and Udupa N.,** 1997, Niosome Encapsulated Ciprofloxacin and Norfloxacin BCD Complexes. *J Pharm Pharmacol.*; 49(2): 145-149 pp.
- Sheena I., P., Singh U., V., Kamath R., Uma Devi P., and Udupa N.,** 1998, Niosomal withaferin A, with better tumor efficiency. *Indian J. Pharm. Sci.*; 60(1):45-48 pp.
- Vyas S., P., Mysore N., Jaitley V., and Venkatesan, N.,** 1998, Discoidal niosome based controlled ocular delivery of timolol maleate. *Pharmazie.*; 53: 466–469 pp.
- Namdeo A., Mishra P., R., Khopade A., J., and Jain N., K.,** 1999, Formulation and Evaluation of Niosome Encapsulated Indomethacin. *Indian Drugs.*; 36(6): 378-380 pp.
- Arunothayanam P., Turton J., A., Uchegbu I., F., and Florence A., T.,** 1999, Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH)-Loaded Polyhedral and Spherical/Tubular Niosomes. *J Pharm Sci.*; 88: 34–38 pp.
- Gayatri D., S., Venkatesh P., and Udupa N.,** 2000, Niosomal Sumatriptan Succinate for Nasal Administration. *Int J Pharm Sci.*; 62(6):479-481
- Ruckmani, K., Jayakar, B., and Ghosal S., K.,** 2000, Nonionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabine hydrochloride for effective treatment of leukemia: encapsulation, storage and in vitro release. *Drug Dev. Ind. Pharm.*; 26: 217–222 pp.
- Japtap A., and Inamdar D.,** 2001, Study of antiparkinson's activity of plain and niosomal pentoxifylline. *Ind. J. Pharm. Sci.*; 63(1): 49–54 pp.
- Agarwal R., Katare O., P., and Vyas S., P.,** 2001, Preparation and invitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol. *Int. J. Pharm.*; 228: 43-52 pp.
- Fang J., Hong C., Chiu W., and Wang Y.,** 2001, Effect of Liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int. J. Pharm.*; 219: 61–72 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Manconi M., Sinico C., Donatella V., Loy G., and Fadda A., M.,** 2002, Niosomes as carriers for tritenion. I. Preparation and properties. *Int. J. Pharm.*; 234: 237-248 pp.
- Hao Y., Zhao F., Li N., Yang Y., and Li K.,** 2002, Studies on a high encapsulation of colchicine by a niosome System. *Int J Pharm.*; 244: 73–80 pp.
- Carafa M., Santucci E., and Lucania G.,** 2002, Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies. *Int. J. Pharm.*; 231: 21-32 pp.
- Desai T., R., and Finlay W., H.,** 2002, Nebulization of Niosomal all trans-retinoic acid: an inexpensive alternative to conventional liposomes. *Int. J. Pharm.*; 241: 311–317 pp.
- Shahiwala A., and Misra A.,** 2002, Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide. *J Pharm Sci.*; 5: 220-225 pp.
- Satturwar P., M., Fulzele S., V., Nande V., S., and Khandare J., N.,** 2002, Formulation and Evaluation of Ketoconazole Niosomes. *Ind J Pharm Sci.*; 64(2): 155-158 pp.
- Rajnish A., and Ajay, S.,** 2010, Release Studies of Ketoconazole Niosome Formulation. *J Global Pharma Tech.*; 2(1): 125-127 pp.
- Balasubramanian A., Kumar V., A., and Pillai K., S.,** 2002, Formulation and In-Vivo Evaluation of Niosome Encapsulated Daunorubicin Hydrochloride. *Drug Dev Ind Pharm.*; 28(10): 1181-1193 pp.
- Manconi M., Valenti D., Sinico C., Lai F., Loy G., and Anna M., F.,** 2003, Niosomes as carriers for tretinoin II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int J Pharm.*; 260: 261–272 pp.
- Luciani A., Olivier J., C., and Clement O.,** 2004, Glucose Receptor MR Imaging of Tumors: Study in Mice with PEGylated Paramagnetic Niosomes. *Radiology.*; 231(1):135-142 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dufes C., Gaillard F., Uchegbu I., F., Schätzlein A., G., Olivier J., C., and Muller J., M.,** 2004, Glucose Targeted Niosomes Deliver Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) to Brain. *Int J of Pharm.*; 285(1-2): 77-85 pp.
- Aggarwal D., Garg A., and Kaur I., P.,** 2004, Development of topical niosomal preparation of acetazolamide. Preparation and evaluation. *J Pharm Pharmacol.*; 56: 1509-1513 pp.
- Guinedi A., S., Nahed D., M., Samar M., and Rania M., H.,** 2005, Preparation and evaluation of reverse phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *Int J Pharm.*; 306: 71–82 pp.
- Khandare J., N., and Bobade, J.,** 2005, Preparation and evaluation of reverse phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers for acetazolamide. *Int J pharm.*; 306: 71 – 82 pp.
- Aggarwal, D., Pal, D., Mitra, A., K., and Kaur, I., P.,** 2007, Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. *Int. J. Phar.*; 338: 21-26 pp.
- Varghese V., Vitta P., Bakshi V., Agarwal S., and Pandey S.,** 2004, Niosomes of primaquine: effect of sorbitan esters (spans) on the vesicular physical characteristics. *Indian drugs.*; 41: 101-103 pp.
- Muzzalupo R., Trombino S., Iemma F., Puoci F., Mesa C., L., and Picci N.,** 2005, Preparation and characterization of bolaform surfactant vesicles. *Colloids Surf B. Biointerfaces.*; 46(2): 78–83 pp.
- Aggarwal D., and Kaur I., P.,** 2005, Improved Pharmacodynamics of Timolol Maleate from a Mucoadhesive Niosomal Ophthalmic Drug Delivery System. *Int J Pharm.*; 290(1-2): 155-159 pp.
- Palozza P., Muzzalupo R., Trombino S., Valdannini A., and Picci N.,** 2006, Solubilization and stabilization of beta -carotene in niosomes: delivery to cultured cells. *Int J Pharm.*; 139: 32–42 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tabbakhian M., Tavakoli N., Jaafari M., R., and Daneshamouz S.,** 2006, Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes; in vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. *Int J Pharm.*; 323: 1–10 pp.
- Nidhi N., Dubey, and Joly R. Parikh,** 2006, Preparation and optimization of niosomes containing Piroxicam, *Indian Pharmacist.*, 5: 97-103 pp.
- Paradakhty, A., and Varshosaz, J.,** 2007, In vitro study of polyethylenealkyl ether niosomes for delivery of insulin; *Int J Pharm.*; 328: 130-141 pp.
- Manconi M., Sinico C., Valenti D., Lai F., and Fadda A., M.,** 2006, Niosomes as carriers for tretinoin III A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. *Int. J. Pharm.*; 311: 11–19 pp.
- Vashney H., M., Tanwar Y., S., Lowalekar R., and Rathod K., S.,** 2007, Designing and characterization of verapamil hydrochloride niosomes. *The Indian Pharmacist.*; 6: 77-79 pp.
- Mokhtar M., Omaima A., S., Mohammed A., H., and Nagia A., M.,** 2008, Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes. *Int. J. Pharm.*; 361: 104–111 pp.
- Karki, R., Mamatha G., C., Subramanya G., and Udupa N.,** 2008, Preparation, characterization and tissue disposition of niosomes containing isoniazid. *Rasayan J. Chem.*; 2: 224-227 pp.
- Elbary A., El-laithy H., M., and Tadros M., I.,** 2008, Sucrose stearatebased proniosome-derived Niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium. *Int. J. Pharm.*; 357: 189–198 pp.
- Kumar sharma, S., Chauhan, M., and Anilkumar, N.,** 2009, Span-60 niosomal oral suspension of fluconazole: formulation and in vitro evaluation. *J Pharm Res Health Care.*; 1(2):142-156 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tamizharasi S., Dubey A., Rathi V., and Rathi J., C.,** 2009, Development and characterization of niosomal drug delivery of gliclazide. *J. Young Pharm.*; 3: 205-209 pp.
- Jadon, P., S., Gajbhiye, V., Jadon, R., S., Gajbhiye, K., R., and Ganesh, N.,** 2009, Enhanced Oral Bioavailability of Griseofulvin via Niosomes. *AAPS PharmSciTech.*; 10(4): 1186-1192 pp.
- Bhaskaran, S., and Lakshmi, P., K.,** 2009, Comparative evaluation of niosome formulations prepared by different techniques. *Acta pharmaceutica Scientia.*; 51: 27-32.
- Sathali A., A., H., and Rajalakshmi G.,** 2010, Evaluation of Transdermal Targeted Niosomal Drug Delivery of Terbinafine Hydrochloride. *Int.J. PharmTech Res.*; 2(3):2081-2089 pp.
- Pavala rani N., Suriyaprakash T., N., K., and Senthamarai R.,** 2010, Formulation and evaluation of rifampicin and gatifloxacin niosomes on logarithmic-phase cultures of mycobacterium Tuberculosis. *Int J Pharma and Bio Sci.*; 1(4): 379-387 pp.
- Solanki, A., B., Parikh, J., R., Parikh, R., H., and Patel, M., R.,** 2010, Evaluation of different compositions of niosomes to optimize aceclofenac transdermal delivery. *Asian J Pharm Sci.* ; 5 (3): 87-95 pp.
- Naveen, G., Vishal, S., Somesh, S., and Aditya, P.,** 2010, Formulation and evaluation of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) for ocular delivery of ofloxacin. *Int J Phar Life Sci.*; 1(7): 413-418 pp.
- Prabhu P., Koland, M., Vijaynarayan K., Harish N., M., Ganesh D., Charyulu R., N., and Sathnarayan D.,** 2010, Preparation and evaluation of niosomes of brimonidine tartrate as ocular drug delivery system. *J Pharm Res Health Care.*; 2(4): 293-301 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mouzam, I., Dehghan M., H., G., and Shaikh Samina M.,** 2011, Development and Characterization of Salmeterol Xinafoate Niosomes for Nasal Delivery. *Ind J Pharm Edu Res.*; 45(2):121-127 p.
- Negi, P., Ahmad, F., J., Ahmad, D., Jain, G., K., and Singh, G.,** 2011, Development of a novel formulation for transdermal delivery of an anti-depressant drug. *Int J Phar Sci and Res.*; 2(7): 1766-1771 pp.
- Mohamed Firthouse P., U., Mohamed Halith S., Wahab S., U., Sirajudeen M., and Kadher Mohideen S.,** 2011, Formulation and evaluation of miconazole Niosomes. *Int.j. Pharmtech res.*; 3(2): 1019-1022 pp.
- Sambathkumar R., Sekharbabu V., Perumal P., Vengateswara Murthy N., Kanagasabi R., and Vijaya Muthu Manikander R.,** 2011, Development and evaluation of cefpodoxime proxetil niosomes using various sorbitan esters. *Res J Pharm Bio Chem Sci.*; 1(2): 213-219 pp.
- Kapoor, A., Gahoi R., and Kumar D.,** 2011, In-vitro drug release profile of Acyclovir from Niosomes formed with different Sorbitan Esters. *Asian J Pharm Life Sci.*; 1 (1):64-70 pp.
- Lakshmi P., K., and Bhaskaran, S.,** 2011, Phase II study of topical niosomal urea gel- an adjuvant in the treatment of psoriasis. *Int J Pharm Sci Rev Res.*; 1(7):1-7 pp.
- Sambhakar S., Singh B., Paliwal S., K., and Mishra P., R.,** 2011, Niosomes as a Potential Carrier for Controlled Release of Cefuroxime Axetil. *Asian J Biochem Pharm Res.*; 1(1):126-136 pp.
- Das, M., K., and Palei, N., N.,** 2011, Sorbitan ester niosomes for topical delivery of rofecoxib. *Ind J Ep Bio.*; 49: 438-445 pp.
- Bankova, V., Castro, S., L., and Marcucci, M., C.,** 2000, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3–15 pp.
- Sforcin, J., M., and Bankova, V.,** (2011), Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?, *Journal of Ethnopharmacology* 133, 253–260 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B., C., ve Ceyran, G.,** May 2002, Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis, *Uludag Bee Journal*, 10-23 s.
- Bankova, V.,** 2005, “Chemical diversity of propolis and the problem of standardization,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, no. 1-2, 114–117 pp.
- Toreti, V., C., Sato, H., H., Pastore, G., M., and Park, Y., K.,** 2013, Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin, *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume, Article ID 697390, 13 pages
- Thomson, W.,** 1990, “Propolis,” *Medical Journal of Australia*, vol. 153, article 654
- Nolkemper, S., Reichling, J., Sensch, K., H., and Schnitzler, P.,** (2010) , Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts, *Phytomedicine* 17, 132–138 pp.
- Kutluca, S., Genç, F., ve Korkmaz, A.,** 2008, Propolis, *Samsun İl Valiliği Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şubesi Yayını*
- Lopes, A., A., Ferreira, T., S., Nesi, R., T., Lanzetti, M., Pereira Pires, K., M., Silva, A., M, Borges, R., M., Ribeiro Silva, A., J., Santos Valença, S., and Cristóvão Porto, L.,** 2013, Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*
- Krell, R.,** 1996, Value-Added Products From Beekeeping, Fao Agricultural Services Bulletin No. 124, *Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome*, Ch 5
- Coneac, G., Gafițanu, E., Hădărugă, N., G., Hădărugă, D., I., Riviș, A., Bandur, G., Pînzaru, I., A., Rusu, G., Urșica, L., Păunescu, V., Gruia, A., Sebeșan, M., Grozescu, I., Lazău, C., and Sfîrloagă, P.,** (2008), Propolis extract/ β -cyclodextrin nanoparticles: synthesis, physico-chemical, and multivariate analyses, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 14, 58-70 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stefan Bogdanov**, February 2014, Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, Bee Product Science, www.bee-hexagon.net
- Silici, S., and Kutluca, S.**, (2005), Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* 99 (1): 69-73 s.
- Koc, A., N., Silici, S., Mutlu-Sariguzel, F., and Sagdic, O.**, (2007), Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technology and Biotechnology* 45 (1): 57-61 pp.
- Silici, S., Koc, N., A., Ayangil, D., and Cankaya, S.**, (2005), Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Journal of Pharmacological Sciences* 99 (1): 39-44 pp.
- Marcucci, M., C.**, (1995), Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99 pp.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., S., Christov, R., and Popov, S.**, (1999), Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3): 235-240 pp.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., and Nakayama, T.**, (2004), Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84 (3): 329-339 pp.
- Farooqui, T., and Farooqui, A.**, (2010), Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Curr Nutr Food Sci* 6: 188-199 pp.
- Hudnall, M.**, (2007), US Patent 7294351: Composition containing fractionated bee propolis
- Silva, V., Genta, G., Möller, M., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., Radu, R., Fernandes, D., Laurindo, F., Heinzen, H., Fierro, W., and Demicola, A.**, (2011), Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. *JAFAC*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pham-Huy, L., He, H., and Pham-Huy, C.,** (2008), Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int.J.Biomed.Sci.* 4: 89-96 pp.
- Banskota, A., H., Tezuka, Y., Adnyana, I., K., Ishu, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., and Kadota, S.,** (2001), Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* 8 (1): 16-23 pp.
- Orsolich, N.,** 2010, A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *JAAS* 2 (1): 1-20 pp.
- Almeida, E., C., D., and Menezes, H.,** 2002, Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 8 (2): 191-212 pp.
- Mirzoeva, O., K., and Calder, P., C.,** 1996, The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. Prostaglandins, *Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 55 (6): 441-449 pp.
- Wu, Z., Z., Takayama, A., Q., Okada, F., Liu, R., Harada, Y., C., Wu, Y., and Nakamshi, H., S., Z.,** 2013, Brazilian Green Propolis Suppresses the Hypoxia-Induced Neuroinflammatory Responses by Inhibiting NF-kappa B Activation in Microglia, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
- Trusheva, B., Trunkova, D., and Bankova, V.,** 2007, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study, *Chemistry Central Journal*, 1:13 pp.
- Ramanauskienė, K., Inkenienė, A., M., Petrikaite, V., and Briedis, V.,** 2013, Total Phenolic Content and Antimicrobial Activity of Different Lithuanian Propolis Solutions, *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume, Article ID 842985, 5 pages

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arslan, S., Perçin, D., Silici, S., Koç, A., N., ve Er, Ö.,** 2010, Farklı Çözücülerle Hazırlanan Propolis Özütlerinin Mutans Streptokoklar Üzerine In Vitro Antimikrobiyal Etkisi, Sağlık Bilimleri Dergisi (*Journal of Health Sciences*) 19(1) 68-73 s.
- Paviani, L., C., Fiorito, G., Sacoda, P., and Cabral, F., A.,** 2013, Different Solvents For Extraction Of Brazilian Green Propolis: Composition And Extraction Yield Of Phenolic Compounds, III. Iberoamerican Conference On Supercritical Fluids Cartagena De Indias (Colombia)
- Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, Valérium Thijan Nobre de Almeida de Castro, Joabe Gomes de Melo, Allan Jonathan Chernichiarro Corrêa, and Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho,** 2012, Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds Contained in Plant Samples, INTECH, Ch 3
- Jadon P., S., Gajbhiye V., Jadon R., S., Gajbhiye K., R., and Ganesh N.,** 2009, Enhanced oral bioavailability of griseofulvin via niosomes, *AAPS PharmSciTech.*;10(4):1186-92 pp.
- Rangasamy, M., et. al.,** Oct-December 2008, Formulation and in vitro evaluation of niosomes encapsulated acyclovir, *Journal of Pharmacy Research* Vol.1 Issue.2
- Ruckmani, K., and Sankar, V.,** September 2010, Formulation and Optimization of Zidovudine Niosomes, *AAPS PharmSciTech*, Vol. 11, No. 3
- Romero Perez, A., et. al.,** Jan 2010, Designing And Evaluation Of Selenite Nanoparticles in Vitro to Improve Selenium Absorption in Ruminants, *Vet Res Commun.*; 34(1): 71-79 pp.
- Carmen Luiza Feitosa De Lima Gomes,** May 2010, Radiosensitization Strategies For Enhanced E-Beam Irradiation Treatment Of Fresh Produce, A Dissertation Of Phd Thesis

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G., L., and Plessi, M.,** 2012, ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts, *Phytochemical Analysis*, 23, 260-266 pp.
- Sravanthi, B.,** Niosomes- Drug Delivery System, Industrial Pharmacy ppt presentation, Erişim Tarihi: 12 Mayıs 2014
- Lembo, D., and Cavalli, R.,** 2010, Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* ; **21**:53-70 pp.
- Silva, B.,** 2001, Long term stability of natural propolis: antimicrobial and chemical evaluations, IADR 87th General Session and Exhibition, April 1-4, 2009
- Hoheisel O.,** The effects of Herstat (3% propolis ointment ACF) application in cold sores: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Research*; 4: 65-75
- Szmeja Z., Kulczynski B., and Konopacki K.,** 1987, Clinical usefulness of the preparation Herpestat in the treatment of Herpes labialis. *Otolaryngol Pol*; 41: 183-8 pp.
- Sahlan, M., and Supardi, T.,** 2013 Jan, Encapsulation Of Indonesian Propolis By Casein Micelle, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*,; 4(1): (P) 297 – 305 pp.
- Luciani, A., et. al.,** 2004, Glucose-Receptor MR Imaging of Tumors: Study in Mice with PEGylated Paramagnetic Niosomes, *Radiology*; 231:135–142 pp.
- Vangala, A., et. al.,** 2006, A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: characterisation, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice, *JPP*, 58: 787–799 pp.
- Verza, S., G., et. al.,** 2011, Determination of galangin in commercial extracts of *Alpinia officinarum* by RP-HPLC-DAD, *Latin American Journal of Pharmacy*, 30 (3): 576-9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Satyavathi, V., et. al.**, 2012, Formulation And Evaluation Of Niosomal In Situ Gel Ocular Delivery System Of Brimonidine Tartrate, *International Journal of Life Science & Pharma Research*, Vol2, Issue 1, 82-95 pp.
- Kamboj, S., Saini, V., and Bala, S.**, 2014, Formulation and Characterization of Drug Loaded Nonionic Surfactant Vesicles (Niosomes) for Oral Bioavailability Enhancement, *The Scientific World Journal*, Article ID 959741
- Socha, R., Galkowska, D., Bugaj, M., and Juszcak, L.**, 2014, Phenolic Composition and Antioksidant Activity of Propolis from Various Regions of Poland, *Nat Prod Res*, Sep 4: 1-7
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., and Nakayama, T.**, 2004, Antioksidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chemistry*, Volume 84, Issue 3, 329-339 pp.
- Nedji, N., and Loucif-Ayad, W.**, 2014, Antibacterial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition, *Asian Pac J Trop Dis*; 4(6): 433-437 pp.
- Osman, İ., H., and Hafez Tantaway, A., A.**, 2013, Antioksidant activity and protective effects of commercial propolis on gentamicin induced nephrotoxicity in rabbits-in vivo study, *Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem*; 38 (4) ; 409–415 pp.
- Taylor&Francis Group, LLC**, 2006, Flavanoids Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, 1212 pages

ÖZGEÇMİŞ

FULDEN ULUCAN

Biyomühendis

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi

İLETİŞİM

Adres: 108/26 Sokak No:3/1 Esenyalı-Karabağlar İZMİR

e-posta: ulucanfulden@gmail.com

EĞİTİM

2012-2014	Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Ege Üniversitesi- İZMİR
2007-2012	Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Ege Üniversitesi-İZMİR
2003-2007	İzmir Anadolu Öğretmen Lisesi

