KIZILÇAM (*Pinus brutia*) KABUĞUNDAN ELDE EDİLEN ANTİOKSİDAN MADDELERİN ENKAPSÜLASYONU VE DENTAL ADEZİV KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Serenay EYÜBOĞLU

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIZILÇAM (*Pinus brutia*) KABUĞUNDAN ELDE EDİLEN ANTİOKSİDAN MADDELERİN ENKAPSÜLASYONU VE DENTAL ADEZİV KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

SERENAY EYÜBOĞLU
0000-0002-7809-6861

Prof. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KIZILÇAM (*Pinus brutia*) KABUĞUNDAN ELDE EDİLEN ANTİOKSİDAN MADDELERİN ENKAPSÜLASYONU VE DENTAL ADEZİV KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Serenay EYÜBOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Pinus brutia (*P. brutia*), yüksek antioksidan içeriğine sahip doğal bir proantosiyanidin kaynağıdır. Proantosiyanidinler ikincil bitki metabolitleridir ve beslenme tıbbında güçlü antioksidanlar olarak kullanılırlar. Çamgiller familyasının bileşiklerinin kabukları ayrıca antimutajenik, antienflamatuar, anti-fungal özellikleri ve yüksek antioksidan içeriği nedeniyle yaraların tedavisinde, bağışıklığın güçlendirilmesinde ve çeşitli hastalıklarda kullanılmaktadır. Bu çalışmada, kızılçam kabukları dört farklı çözücü sistemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir: etanol, metanol, etanol–su (70:30, v/v) ve metanol–su (70:30, v/v). Elde edilen ekstraktların fenolik bileşik profili yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizi dedektör (HPLC–DAD) ile belirlenmiştir. Dolgu malzemesi olarak kullanılması planlanan Kızıl çam kabuklarının çürüğü önleyip önlemediğini belirlemek için *Lacticaseibacillus casei* ve *Lactobacillus acidophilus* probiyotik bakterilerinin geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Kızılçam kabuğu ekstraktının β-siklodekstrin ile enkapsülasyon işlemi için β-siklodekstrin oranı (%w/v), sıcaklık (ºC), Kızılçam kabuğu ekstraktı (mL) ve zaman (dk) optimizasyon parametreleri belirlenmiştir. Optimizasyonda merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılmıştır. Optimum enkapsülasyon verimliliği fenoliklerin antioksidan kapasitesi olarak belirlenmiştir (%85,04±0,16). Dental yapıştırıcı olarak kullanılacak β–siklodekstrin-metakrilat monomeri sentezlenmiştir. Enkapsülasyon işlemi Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT–IR) ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile, sentezlenen β–siklodekstrin–metakrilat monomeri ise FT–IR, SEM ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ile doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dental yapıştırıcılar, antioksidan, *Pinus brutia*, optimizasyon, enkapksülasyon

2024, x + 10 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ENCAPSULATING OF ANTIOXIDANT SUBSTANCES OBTAINED FROM RED PINE (*Pinus brutia*) BARKS AND THEIR USE AS DENTAL ADHESIVE ADDITIVES

Serenay EYÜBOĞLU

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

High antioxidant content proanthocyanidins can be found naturally in *Pinus brutia* (*P. brutia*). Secondary plant metabolites called proanthocyanidins are employed in nutritional medicine as potent antioxidants. Because of its strong antioxidant content, and antimutagenic, anti-inflammatory, and anti-fungal characteristics, the barks of the pine family are also used to cure wounds, boost the immune system, and treat various other ailments. Four distinct solvent solutions were used in this investigation to extract red pine bark: methanol, ethanol, ethanol–water (70:30, v/v), and methanol–water (70:30, v/v). Using a high–performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC–DAD), the phenolic component profile of the extracted materials was ascertained. To find out if the red pine bark, which is intended to be used as a filler substance, prevents caries, *Lacticaseibacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* probiotic bacteria were developed. For the encapsulation process of red pine bark extract with β–cyclodextrin, the optimization parameters of β–cyclodextrin ratio (%w/v), temperature (ºC), red pine bark extract (mL), and time (min) were calculated. The optimization process made use of the central composite design method. The best encapsulation efficiency was found to be 85.04±0.16% for phenolic antioxidant activity. β–cyclodextrin–methacrylate monomer to be used as dental adhesive was synthesized. The encapsulation process was confirmed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT–IR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) and the synthesized β–cyclodextrin-methacrylate monomer was confirmed by FT–IR, SEM and Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Key words: Dental adhesive, antioxidant, *Pinus brutia*, optimization, encapsulation

2024, x + 105 pages.

TEŞEKKÜR

Üniversite eğitim hayatım boyunca öğrencisi olmaktan onur duyduğum, bilimsel anlamda beni her daim bilgisi ile heyecanlandıran aynı zamanda bir anne, bir abla gibi her zaman yanımda olduğunu hissettiren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Saliha ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite eğitimim boyunca akademik anlamda çalışmaktan, tecrübelerinden destek almaktan, beraber kongrelere katılmaktan zevk aldığım ve onur duyduğum sayın hocalarım Doç. Dr. Aslı GÖÇENOĞLU SARIKAYA'ya ve Doç. Dr. Önder AYBASTIER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ekip üyesi olmaktan büyük gurur duyduğum Kromatografi Araştırma Grubu üyeleri olan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Büşra KARKAR, Yüksek Kimyager İlkyaz PATIR, Yüksek Kimyager Gizem BAYAÇLI, Elif TÜLEK, Açelya AKLAN ve Gamze YILDIZ'a deneysel çalışmalardaki yardımlaşmaları ve arkadaşlık bağları ile her daim yanımda oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anlamında beni her zaman destekleyen, her koşulda beni inançları ile kuvvetlendiren ve varlıkları ile güç aldığım sevgili annem Nuran EYÜBOĞLU, sevgili babam Baki EYÜBOĞLU ve sevgili abim Doğanay EYÜBOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Varlığını her daim yanımda hissettiğim, çocukluğumun kahramanı, beni ben yapan değerlerimin baş mimarı canım rahmetli dedem Veysel EYÜBOĞLU'na, eğitimim boyunca beni her daim destekleyen canım dedem İbrahim MERİÇ, sevgili anneannem Seher MERİÇ, sevgili halam Dilek EYÜBOĞLU ve sevgili babaannem Alime EYÜBOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hazırlıktan beri kendimi arkadaşlık konusunda her daim şanslı hissettiren, fikirlerine önem verdiğim, her koşulda yanımda olan, motivasyon kaynağım canım arkadaşım İrem EGE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı TGA-2023-1426 numaralı proje kapsamında destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

Serenay EYÜBOĞLU
12/08/2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Fenolik Bileşikler 3
2.2. Enkapsülasyon 6
2.2.1.Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma) 10
2.2.2. Püskürterek kurutma 11
2.2.3. Ekstrüzyon 12
2.2.4. Koaservasyon 13
2.2.5. İnklüzyon Kompleksleri 14
2.4. Siklodekstrinler 19
2.5. *Pinaceae* (Çamgiller) 23
2.6. *Pinus brutia* Ten. (Kızılçam) 24
3. MATERYAL ve YÖNTEM 28
3.1. Materyal 28
3.1.1. Kızılçam kabuklarının toplanması 28
3.1.2.Tez kapsamında kullanılan cihazlar 28
3.1.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar 31
3.1.3. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler 33
3.1.4. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler 33
3.2. Yöntem 36
3.2.1. Kızılçam kabuklarının (KÇK) ekstraksiyon işlemi 36
3.2.2. KÇK ekstraktlarında bulunan fenolik maddelerin analizi 36
3.2.3. Spektroskopik analizler 37
3.2.4. KÇK ekstraktının β-SD ile enkapsülasyonu 39
3.2.5. KÇK–β–SD enkapsülatının hazırlanması 43
3.2.6. KÇK–β–SD enkapsülatının enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi 44
3.2.7. β-siklodekstrin-metakrilat (β–SD–MA) sentezi 44
3.2.8. Kızılçam kabuğunun mikrobiyolojik analizleri 45
3.2.9. KÇK–β–SD ve KÇK'nın *in-vitro* gastrointestinal salınım çalışması 47
3.2.10. KÇK–β–SD enkapsülatının ve β–SD–MA monomerinin karakterizasyonu 51
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 52
4.1. Kromatografik Bulgular 52
4.2. Spektroskopik Bulgular 60
4.3. KÇK'nın β–SD ile Enkapsüle Edilmesi ve Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 64
4.4. KÇK Ekstraktının Mikrobiyolojik Aktivitesinin İncelenmesi 71
4.5. KÇK ekstraktı ve KÇK–β–SD Enkapsülatının *in*-vitro Gastrointestinal Ortamdaki Salınımının Belirlenmesi 72
4.6. KÇK–β–SD Enkapsülatı ve β–SD–MA Monomerinin FT–IR Analizleri 77

4.7. β–SD, KÇK–β–SD ve β–SD–MA Monomerinin Yüzey Morfolojileri 79
4.8. β–SD ve β–SD–MA Monomerinin NMR Analizleri 84
5. SONUÇ 87
KAYNAKLAR 90
ÖZGEÇMİŞ 104

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
<	Küçüktür
A	Absorbans
b_0	Sabit terim
b_i	Doğrusal etkileşim sabiti
b_{ii}	Parabolik etkileşim sabiti
b_{ij}	Parametre etkileşim sabiti
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
log	Logaritma
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
N	Normalite
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir kısım
R_2	Regresyon katsayısı
sa	Saat
v/v	Hacim/hacim
w/v	Kütle/hacim
y	Yanıt
α	Alfa
β	Beta
ɣ	Gama
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	**Açıklama**
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
AK	Analjezik kapsaisin
ANOVA	Varyans analizi
CAE	Kateşin eşdeğeri
CE	Siyanidin eşdeğeri
DF	Serbestlik derecesi
DMF	*N*,*N*-dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSC	Taramalı diferansiyel kalorimetre
EOY	*Euterpe oleracea* Mart yağı
EPC	Epikateşin
EPCG	Epikateşin gallat
EPGC	Epigallokateşin
EPGCG	Epigallokateşin gallat
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HPLC-DAD	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diod serili dedektör
KÇK	Kızılçam kabuğu
KÇK-β-SD	Kızılçam kabuğu-β-siklodekstrin
KE	Kateşin eşdeğeri
LA	Lokal anestezikler
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MRS	Man Ragosa
MS	Ortalamaların karesi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PCA	Protokatekuik asit
PCA2	Proantosiyanidin A2
QCT	Kuersetin
QE	Kuersetin eşdeğeri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPB	Red pine bark
SD	Siklodekstrin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SGF	Simüle mide sıvısı
SIF	Simüle bağırsak sıvısı
SS	Karelerin toplamı
SSF	Simüle ağız sıvısı
TE	Troloks eşdeğeri
te	Tespit edilemedi
TGA	Termogravimetrik analiz
UV-GB	Ultraviyole-görünür bölge
XRD	X–ışını kırınımı
β-SD	β–siklodekstrin
β-SD-MA	β–siklodekstrin-metakrilat

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Polifenollerin sınıflandırılması	3
Şekil 2.2.	Enkapsülasyon işlemi	7
Şekil 2.3.	Farklı mikrokapsüllerin morfolojisi	8
Şekil 2.4.	Enkapsülasyon yöntem ve çeşitleri	9
Şekil 2.5.	Dondurarak kurutma yönteminin aşamaları	11
Şekil 2.6.	Püskürterek kurutma yönteminin aşamaları	12
Şekil 2.7.	Ekstrüzyon yönteminin uygulanması	13
Şekil 2.8.	Koaservasyon yönteminin uygulanması	14
Şekil 2.9.	İnklüzyon kompleksi oluşumu	15
Şekil 2.10.	İnklüzyon komplekslerinde kullanılan konak moleküller	16
Şekil 2.11.	Siklodekstrin yapısı	19
Şekil 2.12.	Siklodekstrin türevleri	20
Şekil 2.13.	*Pinaceae*	23
Şekil 2.14.	*Pinus brutia* Ten. kabuk ve toz hali	24
Şekil 2.15.	*Pinus brutia* Ten. taksonomisi	25
Şekil 2.16.	*Pinus brutia* Ten. içeriğinde bulunan fenolik bileşikler	26
Şekil 2.16.	*Pinus brutia* Ten. içeriğinde bulunan fenolik bileşikler (devam)	27
Şekil 3.1.	KÇK çözücü ekstraksiyonunun şematik gösterimi	36
Şekil 3.2.	KÇK–β–SD enkapsülatının hazırlanması	43
Şekil 3.3.	KÇK–β–SD enkapsülatının enkapsülasyon etkinliğinin spektroskopik olarak belirlenmesi	44
Şekil 3.4.	Serbest probiyotik bakterilerinin liyofilize KÇK ekstraktı ile mikrobiyolojik analiz şeması	46
Şekil 3.5.	KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının SSF ortamındaki fenolik madde salınım miktarının belirlenmesi	48
Şekil 3.6.	KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının SGF ortamındaki fenolik madde salınım miktarının belirlenmesi	49
Şekil 3.7.	KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının SIF ortamındaki fenolik madde salınım miktarının belirlenmesi	50
Şekil 4.1.	KÇK etanol çözücüsü ile ekstraktının kromatogramı (280 nm)	55
Şekil 4.2.	KÇK etanol–su (%70-30) çözüüsü ile ekstraktının kromatogramı (280 nm)	56
Şekil 4.3.	KÇK metanol çözüüsü ile ekstraktının kromatogramı (280 nm)	57
Şekil 4.4.	KÇK metanol–su (%70-30) çözüüsü ile ekstraktının kromatogramı (280 nm)	58
Şekil 4.5.	Kızılçam kabuğu–β–siklodekstrin (KÇK–β–SD) enkapsülasyon etkinliği için üç boyutlu yanıt yüzey grafiği (β–SD oranı ve sıcaklığın enkapsülasyon verimine etkisi)	68
Şekil 4.6.	Kızılçam kabuğu–β–siklodekstrin (KÇK–β–SD) enkapsülasyon etkinliği için üç boyutlu yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık ve zamanın enkapsülasyon verimine etkisi)	69

Şekil 4.7.	Toplam fenolik madde cinsinden ardışık *in-vitro* gastorintestinal salınım grafiği (A: SSF (5 dk), SGF (120 dk), B: SSF (5 dk), SGF (120 dk) ve SIF (120 dk) ortamı)	75
Şekil 4.8.	Antioksidan kapasite cinsinden ardışık *in-vitro* gastorintestinal salınım grafiği (A: SSF (5 dk), SGF (120 dk), B: SSF (5 dk), SGF (120 dk) ve SIF (120 dk) ortamı)	76
Şekil 4.9.	β–siklodekstrin (β–SD) örneklerinin FT-IR spektrumları (a: β–siklodekstrin, b: liyofilize kızılçam kabuğu(KÇK) ekstraktı, c: kızılçam kabuğu–β–siklodekstrin (KÇK–β–SD), d: β–siklodekstrin–metakrilat (β–SD–MA)	78
Şekil 4.10.	β–SD SEM görüntüleri (A: 1000X büyütme, B: 2000X büyütme)	80
Şekil 4.11.	Liyofilize KÇK ekstraktı SEM görüntüleri (A: 1000X büyütme, B: 2000X büyütme)	81
Şekil 4.12.	KÇK–β–SD SEM görüntüleri (A: 1000X büyütme, B: 2000X büyütme)	82
Şekil 4.13.	β–SD–MA SEM görüntüleri (A: 2000X büyütme, B: 3000X büyütme)	83
Şekil 4.14.	β–SD NMR spektrumu	85
Şekil 4.15.	β–SD–MA NMR spektrumu	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

			Sayfa
Çizelge	2.1.	Mikroenkapsülasyonda kullanılan duvar materyalleri ve kullanılan enkapsülasyon teknikleri	9
Çizelge	2.2.	Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri	21
Çizelge	3.1.	Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve amaçları	28
Çizelge	3.1.	Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve amaçları (devam)	29
Çizelge	3.1.	Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve amaçları (devam)	30
Çizelge	3.2.	Tez kapsamında kullanılan kimyasallar	31
Çizelge	3.2.	Tez kapsamında kullanılan kimyasallar (devam)	32
Çizelge	3.3.	Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler	33
Çizelge	3.4.	HPLC–DAD çalışma koşulları	37
Çizelge	3.5.	Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri	40
Çizelge	3.6.	KÇK–β–SD enkapsülasyonu için deneysel tasarım	42
Çizelge	4.1.	Standart fenolik maddelerin kalibrasyon verileri	53
Çizelge	4.2.	KÇK çözücü ekstraksiyonu fenolik madde içeriği (mg/g örnek)	54
Çizelge	4.3.	Spektroskopik yöntemler için kalibrasyon verileri	61
Çizelge	4.4.	KÇK çözücü ekstraksiyonu spektroskopik bulguları	61
Çizelge	4.5.	KÇK–β–SD enkapsülasyonu için ANOVA sonuçları	65
Çizelge	4.6.	KÇK–β–SD enkapsülasyonu için ikinci dereceden polinom denklemi	66
Çizelge	4.7.	KÇK–β–SD enkapsülasyon etkinliğinin tahmini ve deneysel değerlere sahip merkezi kompozit dizayn tasarımı	67
Çizelge	4.8.	Deneysel-tahmini değerler ve optimum koşullar	70

1. GİRİŞ

Vücutta dış etkenlere bağlı olarak serbest radikallerin artması, proteinler, lipidler, enzimler, RNA ve DNA gibi biyomoleküllere saldırarak oksidatif hasara neden olur. Serbest radikaller, son değerlik kabuklarında bir/birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip, oldukça reaktif moleküllerdir. Bir molekülden elektron almaları ya da eşleşmemiş elektronlarını bağışlamaları nedeniyle kararsızdırlar. Reaktif oksijen türleri (ROS) serbest radikaller ($O_2^{\bullet -}$, $^{\bullet}OH$, $HO_2^{\bullet}$ vb.), oksidanlar (O_2, H_2O_2, HOCl vb.), oksijen ve demir komplekslerini içermektedir. Bu reaktif oksijen türleri başta mitokondri olmak üzere hücre organellerinde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar sonucu veya yaşlanma, radyasyon, yüksek oksijen basıncı, inflamasyon ve kimyasal maddelere maruz kalma gibi sebeplerle oluşarak oksidatif strese neden olurlar (Parcheta, Świsłocka, Orzechowska, Akimowicz, Choińska ve Lewandowski, 2021). Oluşan bu oksidatif hasarın, yaşlanma ve beraberinde kalp hastalığı, katarakt, bilişsel işlev bozukluğu ve kanser gibi çeşitli dejeneratif hastalıklarda nedensel bir rol oynadığı bilinmektedir. Doğal bileşenlerde bulunan ve izole edilen farklı biyolojik aktivitelere sahip olan fenolik bileşikler, serbest radikalleri engellemek için kullanılmaktadır. Fenolik bileşikler, antioksidan ve radikal süpürücü özelliklerinin yanı sıra anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-radyasyon, immünomodülatör, hepatoprotektif etkiler, anti-inflamatuar ve anti-kanser aktiviteleri gibi pek çok terapötik etkilere sahiptir. Fenolik bileşiklerin, insan vücudunda metabolizma sonrası oluşan serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı nötralize ederek, birçok hastalığa neden olabilen ve doku fonksiyonunda bozulma veya DNA hasarı ile sonuçlanabilen zincirleme reaksiyonları engellediği bilinmektedir.

Antioksidanlar, hücredeki serbest radikalleri ve ROS'ları nötralize eden bileşiklerdir. Antioksidanlar temel olarak sentetik ve doğal olarak ikiye ayrılabilir. Aynı zamanda kaynaklarına göre endojen ve eksojen olarak, etkilerine göre enzimatik/enzimatik olmayan, çözünürlüklerine göre de suda/yağda çözünen olarak gruplandırılabilirler. Doğal antioksidanlar genellikle bitki kaynaklarından elde edilen, bozulma, renk, tat ve koku değişimi gibi etkileri engelleyen bileşiklerdir. Sentetik antioksidanlar, özellikle gıda ürünlerinin korunmasında kullanılmak üzere laboratuvar ortamlarında bazı kimyasal bileşiklerin kombinasyonları ile sentezlenen bileşiklerdir (Uzombah, 2022). Endojen

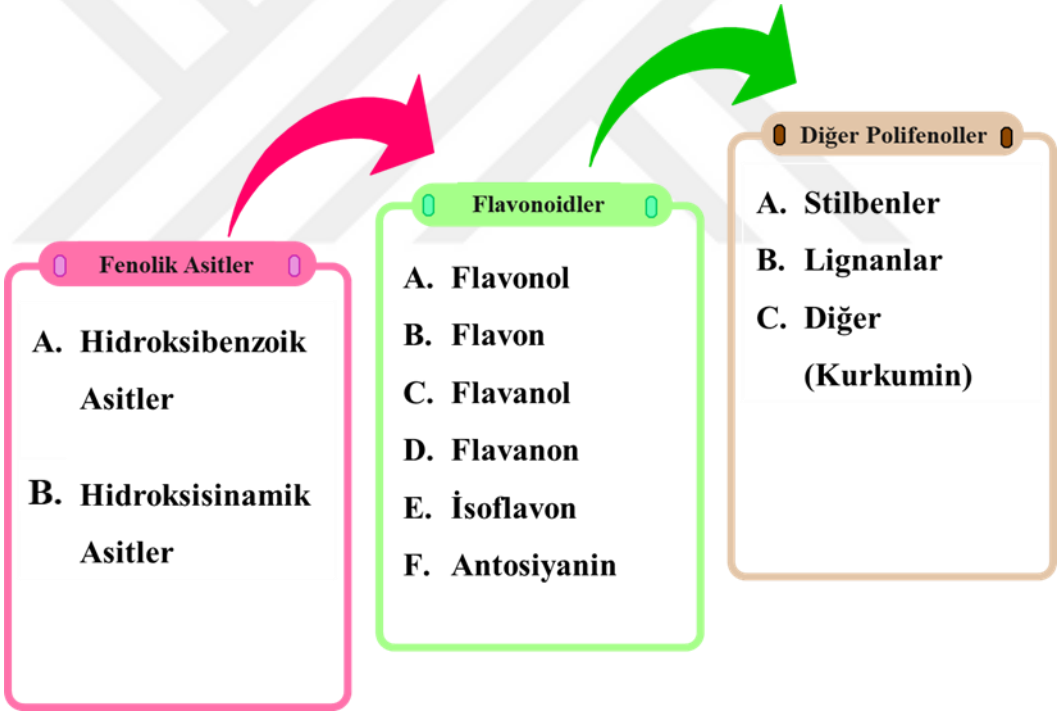
kaynaklı antioksidanlar enzimatik/enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki alt grupta incelenebilirler. Bitkilerde doğal olarak bulunan fenolik bileşikler biyolojik aktiviteye sahiptir. Tıbbi bitkilerin kullanımı çeşitli hastalıkların tedavisinde çeşitli fenolikler açısından büyük önem taşımakta ve son zamanlarda giderek artmaktadır. Başta orman bitkileri olmak üzere bitkisel kaynaklardan elde edilen ürünler de her geçen gün artmaktadır (Şahin, Eyüboğlu, Karkar ve Ata, 2024). Endüstride özellikle gıdaları zenginleştirmek, endüstriyel sorunları ortadan kaldırmak için üretim aşamasında gıda maddelerinin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle kapsülleme teknikleri ile son ürünün koruma, stabilite, raf ömrü gibi faktörlerin düzenlenmesi için doğal kaynaklı biyoaktif bileşenler kullanılmaktadır (Zehiroglu ve Ozturk Sarikaya, 2019). Enkapsülasyon, duvar materyali (polimer, karbohidrat vb.) ve çekirdek kısım olarak tanımlanan biyoaktif bileşenlerin koruma altına alınması ve nanometre-milimetre boyutları arasında kapsüller oluşturmak için başvurulan bir yöntemdir. Çeşitli çevresel etmenlerden (nem, ısı, ışık, oksijen vb.) etkilendiği bilinen biyoaktif bileşenlerin bozulmasını engellemek, çözünürlüğünü arttırmak, stabilitesini korumak gibi birçok faktörden dolayı çekirdek materyallerin kapsüllenmesi işlemleri gerçekleştirilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında çeşitli toprak koşullarında yetiştirilen ve ülkemizde de yetiştirilmesi hızla gelişmekte olan Kızılçam (*Pinus brutia*) ağacı kabukları materyal olarak seçilmiştir. Proantosiyanidinlerin besleyici tıpta güçlü antioksidanlar olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle kızılçam kabuğunda bulunan fenolik bileşenler β-siklodekstrin ile optimum koşullarda enkapsüle edilmiştir. Enkapsüle edilen β-siklodekstrinin *in vitro* gastrointestinal ortamdaki fenolik bileşenlerin salım miktarları analiz edilmiştir. β-siklodekstrin metakrilat grupları kullanılarak monomer sentezlenmiş ve tez çalışmasında elde edilen enkapsülat ve β-siklodekstrin-metakrilat monomeri karakterize edilmiştir. Böylece yeni bir fonksiyonel dental adeziv katkı maddesi eldesine yeni çalışmalar kazandırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fenolik Bileşikler

Bitkiler aleminde oldukça yaygın olup, meyve-sebze gibi doğal kaynaklı ürünlerde miktarsal olarak farklı oranlarda bulunan, kimyasal olarak aromatik benzen halkasına bağlı hidroksil ($^{-}$OH) grubunu ve türevlerini içeren bileşenler fenolik bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Fenolik bileşikler, bitkilerde bulunan ikincil metabolit maddelerdir. Bir diğer ismi polifenoller olarak bilinen doğal fenolik bileşikler fenolik asitler, flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere 3 ayrı başlık altında incelenebilirler. Ayrıca Cosme, Rodríguez, Espino ve Garrido, 2020 fenolik bileşikleri insan diyetinde bulunan en önemli sınıflara göre; fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler olarak sınıflandırmıştır.



Şekil 2.1. Polifenollerin sınıflandırılması

Canlı hücrelerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar, ultraviyole ışınlar, hava kirleticileri, sigara dumanı vb. faktörlere maruz kalınması durumunda insan vücudunda serbest radikaller oluşmaktadır (Şahin ve diğerleri, 2024). Kararsız olan bu serbest radikallerin

reaktif özelliklere sahip oldukları süre boyunca protein, DNA, karbohidrat, lipit gibi biyolojik hücrelerde hasar oluşmasına neden olur. Bu çeşitli çevresel faktörler sonucu oluşan serbest radikallerin artması ise oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasına yol açar ve doğal savunma mekanizmasının etkisiz hale gelmesine neden olur (Jakubczyk, Melkis, Janda-Milczarek ve Skonieczna-Żydecka, 2024; Karkar ve Şahin, 2022). Biyomoleküllerin bu oksidatif hasarına bağlı olarak kanser, kardiyovasküler ve damar sertliği yani ateroskleroz gibi hastalıklar ortaya çıkabilir (Şahin ve diğerleri, 2024). Dolayısıyla özellikle antioksidan özelliği bulunduran bileşenlerin kullanılması, vücutta oluşan/oluşacak serbest radikalleri etkisiz hale getirmesi için önem kazanmaktadır (Jakubczyk ve diğerleri, 2024; Karkar ve Şahin, 2022). Biyomoleküllerin bu oksidatif hasarına bağlı olarak kanser, kardiyovasküler ve damar sertliği yani ateroskleroz gibi hastalıklar ortaya çıkabilir (Erken, Şahin, Karkar, Akça ve Özakın, 2022; Prasanth, Sivamaruthi, Chaiyasut ve Tencomnao, 2019). Gıda maddelerinde bulunan fenolik bileşiklerin sağlık açısından öneme sahip olduğu bilinmektedir. Gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin fizyolojik olarak işlevlerini tamamlayabilmeleri için biyoyararlanımlarının etkili olması gerekmektedir.

- Olgunlaşma aşaması (gıda bileşimi üzerine doğrudan etkilidir),
- Gıda işleme süreçleri (ısıl işlem, liyofilizasyon vb.)
- Yaş, cinsiyet, genetik gibi faktörler biyoyararlanımı etkileyen faktörlerdendir (Cosme ve diğerleri, 2020).

Fenolik bileşiklere olan ilgi, biyolojik etkileri ve umut verici terapötik uygulamaları nedeniyle son on yılda önemli ölçüde artmıştır (Rohilla, 2023). Sağladığı faydalar doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan eylemleriyle ilişkilidir. Doğrudan etki olarak fenolik bileşikler oksidan türlere elektron vererek serbest radikalleri temizleyebilir ve metal iyonlarını şelatlayabilir. Dolaylı etki olarak ise fenolik bileşikler antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak veya pro-oksidan etkileri indükleyen enzimlerin inhibe edilmesi ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesini azaltabilirler (Cosme ve diğerleri, 2020).

Fitokimyasallar, antioksidan, antiproliferatif, antianjiyogenik, proapoptotik ve antikanser özelliklerinden dolayı günümüzde hem kanserin önlenmesinde hem de tedavisinde büyük önem kazanmaktadır. Bitkilerde doğal olarak bulunan bu fenolik bileşiklerin biyolojik aktiviteye sahip olduğu aynı zamanda antioksidan özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal, anti-fungal ve anti-inflamatuar aktivitelere de sahip oldukları bilinmektedir (Şahin ve Karkar, 2019). Fenolik bileşiklerin sahip olduğu bu aktivitelerden antimikrobiyal özelliği enzimlerdeki anahtar-kilit ilişkisi ile ilgilidir. Fenolik bileşikler, bünyelerinde bulunan $^{-}$OH grupları ile anahtar özelliğe sahip enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak antimikrobiyal özelliğe sahip olurlar. Yapıda bulunan (aromatik halka) $^{-}$OH gruplarının konumu tanımlanan bu aktiviteye doğrudan etki etmektedir (Cosme ve diğerleri, 2020).

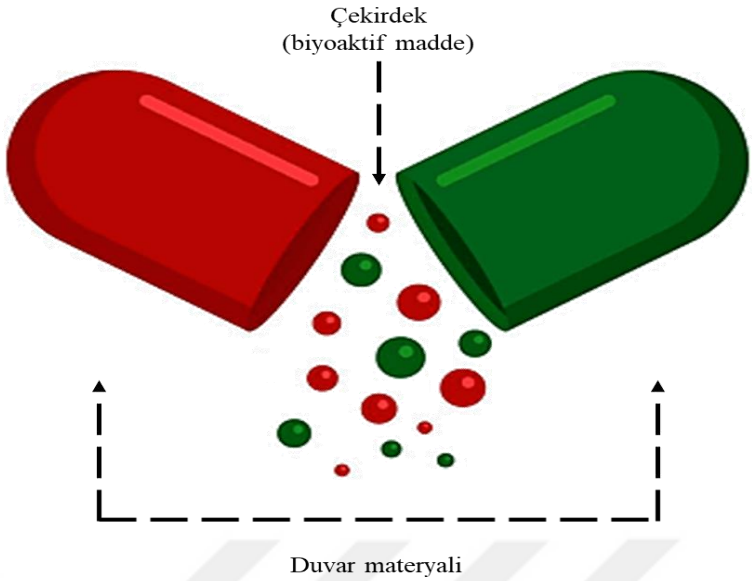
Fenolik bileşikler, apoptozisi teşvik eden, proliferasyonu azaltan ve kanserin çeşitli yönlerini (anjiyogenez, metastaz vb.) hedef alan sitotoksik anti-kanser ajanları olarak büyük bir potansiyel sergilemektedir (Abotaleb, Liskova, Kubatka ve Büsselberg, 2020). Kanser, hücresel homeostazisin geri dönüşü olmayan bir bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar, sadece serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi ile görevli değil, aynı zamanda vücudumuzun bağışıklık dengesini artırmada da görevlidir. Bu görevlerinden dolayı kanser hastalarında bulunan çekinik (resesif) genlere etki etmesi sonucu kanserli hücreleri inhibe ederek anti-kanser aktivite göstermektedir (Zahra ve diğerleri, 2021). Sonuç olarak fenolikler çeşitli kanser türlerinin tedavisinde güçlü adaylardır ve çeşitli moleküler hedeflere (çoğalma, anjiyogenez, büyüme ve farklılaşma, metastaz ve apoptoz) etki ederler. Ancak etkinliklerinin kesinleştirilmesi ve yan etkilerinin değerlendirilmesi için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır. Açıkça klinik müdahale eksikliği nedeniyle, fitokimyasalların anti-kanser potansiyelinin izole veya karışım olarak değerlendirilmesinin klinik uygulamada da uygulanmasının gerekli olduğu düşünülmektedir (Şahin ve Karkar, 2019). Doğal bileşikler, geleneksel ilaçlarla karşılaştırıldığında daha düşük yan etkileri, düşük maliyetleri ve erişilebilirlikleri nedeniyle kanser tedavisinde popülerlik kazanmaktadır (Bouyahya, Omari, Bakrim, Hachlafi, Balahbib, Wilairatana ve Mubarak, 2022).

Kondanse tanenler olarak da bilinen proantosiyanidinler flavonoid biyosentezinin bir son ürünü olarak üretilen monomerik flavan-3-ollerin oligo veya polimerleridir (Rauf, Imran,

Abu-Izneid, Ul-Haq, Patel, Pan, Naz, Silva, Saeed ve Suleira, 2019). Proantosiyanidinler doğal fenolik polimerlerin ligninden sonra doğada miktarsal açıdan en bol bulunan ikinci grup olarak bilinirler (Panzella ve Napolitano, 2022). Proantosiyanidinlerin temel yapıtaşları kateşin ve epigallokateşindir. Ancak sınırlı miktarda da olsa gallokateşin, epigallokateşin, afzelekin ve apiafzelekin doğal kondanse tanenleri (proantosiyanidinleri) temsil eden monomerik birimlerdir (Panzella ve Napolitano, 2022; Rauf ve diğerleri, 2019). Lökoantosiyanidin redüktaz, proantosiyanidin biyosentezinde ilk işlenen adım olarak hizmet eden kateşinin sentezini katalize eder. Proantosiyanidinler, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bir savunma olarak çeşitli bitkilerin çiçeklerinde, kabuklu yemişlerde, meyve kabukları ve tohumlarında bulunur (Rauf ve diğerleri, 2019). Proantosiyanidinlerin antioksidan, anti-karsinojenik, anti-alerjik, anti-inflamatuar, anti-bakteriyel, kardiyoprotektif, bağışıklık uyarıcı vb. etkiler sunduğu bilinmektedir (Pastor-Villaescusa, Rodriguez ve Rangel-Huerta, 2018).

2.2. Enkapsülasyon

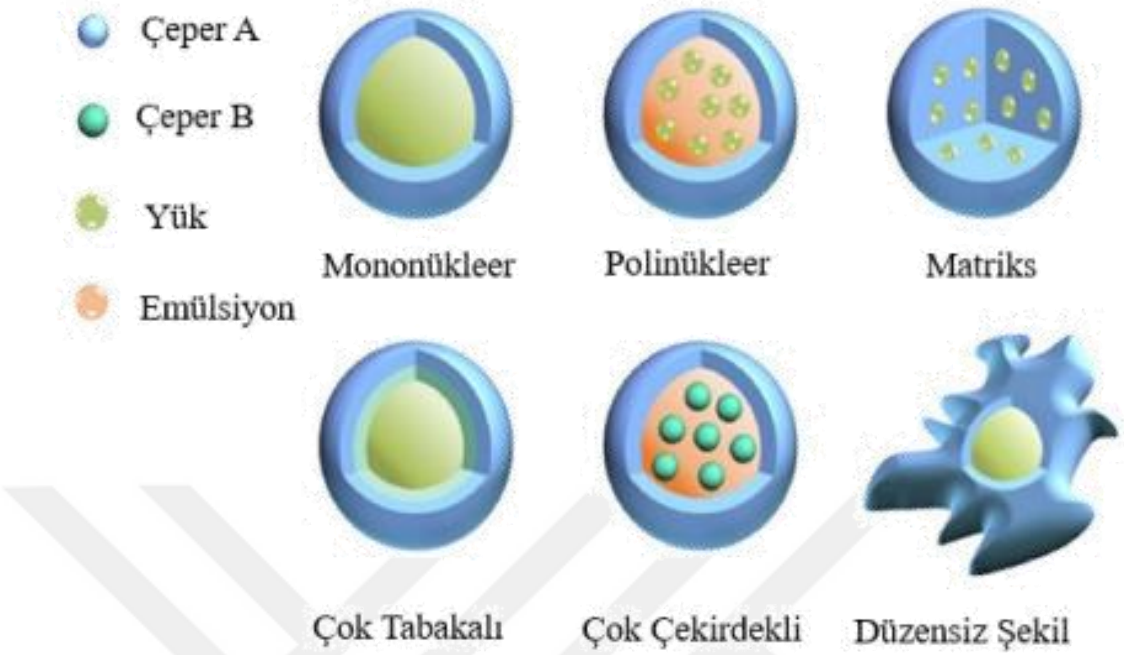
Biyoaktif bileşenlerin içerdikleri aromalar ve uçucu bileşenler çevresel faktörlerden etkilenerek sahip oldukları farmasötik etkilerini zamanla kaybedebilirler. Dolayısı ile biyoaktif bileşen temelli ürünlerin üretimi haricinde depolanması, taşınması ve hatta tüketimi sırasında kontrollü bir şekilde salınımı için gerekli kapsülleme işlemlerinin yapılması gerekmektedir. Biyoteknoloji, gıda ve gıda paketleme, ilaç, kozmetik gibi endüstriyel alanlarda kapsülleme yani enkapsülasyon yöntemine başvurulmaktadır (Buldur, 2012). Enkapsülasyon; nem, ısı, ışık, oksijen gibi oksidasyona sebep olan çevresel etmenlerden dolayı kararsız olan biyoaktif bileşiklerin termal stabilitesini arttırmak, tat ve koku girişimlerini engellemek, çevresel dış faktörlerden korumak amacıyla gerçekleştirilen işlemdir (Erdem, Gündoğan, Yılmaz, Sezgin, Summakoğlu ve Şakıyan Demirkol, 2021; Gibbs, Kermasha, Alli ve Mulligan, 1999). Enkapsülasyon işleminin temelinde, çekirdek olarak isimlendirilen kapsüllenecek biyoaktif bileşenler bulunurken, enkapsülasyon işleminde kapsülleme basamağı için bir duvar materyali gerekmektedir (Gibbs ve diğerleri, 1999).



Şekil 2.2. Enkapsülasyon işlemi

Protein veya karbohidrat yapılı duvar materyali kullanılarak enzim, karbohidrat, mikroorganizmalar gibi biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesi sağlanabilmektedir. Enkapsülasyon yöntemi elde edilecek kapsüllerin boyutlarına bağlı olarak mikro (1-1000 µm) ve nano (1-1000 nm) enkapsülasyon olmak üzere iki ayrı alt başlık altında incelenmektedir (Karkar, Patır ve Şahin, 2023; Saifullah, Shishir, Ferdowsi, Tanver Rahman ve Van Vuong, 2019).

1950'li yıllarda karbon içermeyen fotokopi kağıdı üretiminde basınç duyarlı kaplamaların araştırılması için mikroenkapsülasyon ürünlerinin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır (Gibbs ve diğerleri, 1999). Mikroenkapsülasyon tekniği özellikle sıvı damlacıkların, partiküllerin ya da gaz formundaki bileşenlerin bir duvar materyali yardımı ile kaplanarak işlevselliğinin artırılması amacıyla kullanılan yöntemdir (Jiménez-Villeda ve diğerleri, 2023). Mikroenkapsülasyon teknolojisinde genellikle duvar materyali olarak karbohidratlar (nişasta, kitosan, sakkaroz gibi), proteinler (peynir altı suyu, kazein gibi), gamlar kullanılmaktadır (İlter, Koç, Demirel, Conk Dalay ve Kaymak Ertekin, 2022; Öztürk ve Temiz, 2018; Peixoto, Raimundini Aranha, Nardino, Defendi ve Suzuki, 2022). Dolayısıyla enkapsülasyon sonrası elde edilecek kapsüllerin formunu kullanılan duvar materyali direkt olarak etkilemektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Farklı mikrokapsüllerin morfolojisi

Yüksek verimlilikle kapsüller elde etmek için kullanılacak duvar materyali;

- Biyoaktif materyalin özelliklerini engelleyici herhangi bir reaksiyona girmemeli,
- Biyoaktif materyali depolama koşulları altında gelebilecek dış etkenlerden koruyabilmeli,
- Enkapsülasyon basamakları boyunca hazırlığı ve kullanımı kolay olmalı,
- Ekonomik açıdan uygun maliyette olmalıdır.

Enkapsülasyon yöntemleri kimyasal süreçler, fizikokimyasal süreçler ve fiziksel süreçler olmak üzere 3 kategori altında incelenmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Enkapsülasyon yöntem ve çeşitleri

Mikroenkapsülasyon tekniğinde kullanılabilecek duvar materyalleri ve kullanılabilecek enkapsülasyon yöntemleri Çizelge 2.1'de belirtildiği şekildedir (Öztürk ve Temiz, 2018; Tutun ve Yurdakul, 2022).

Çizelge 2.1. Mikroenkapsülasyonda kullanılan duvar materyalleri ve kullanılan enkapsülasyon teknikleri

Kategori	Duvar Materyali	Enkapsülasyon Yöntemi
Karbohidratlar	Nişasta, kitosan, dekstrin türevleri (siklodekstrin, maltodekstrin vb.)	Püskürterek kurutma Liyofilizasyon Ekstrüzyon Koaservasyon
Selüloz	Karboksimetilselüloz, etilselüloz vb.	Koaservasyon
Gamlar	Karragenan, aljinik asit, agar	Püskürterek kurutma
Lipidler	Vaks, parafin	Lipozom Emülsiyon
Proteinler	Kazein, albumin, peptidler	Emülsiyon Püskürterek kurutma

Mikroenkapsülasyon yöntemi gıda endüstrisinde çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanıldığı bilinen yöntemdir (Ghosh, Sarkar, Das ve Chakraborty, 2021). Ancak son zamanlarda enkapsüle edilen biyoaktif materyallerin tat, koku, nem gibi faktörlerden korunması, çevresel faktörlerden korunması, termal stabilitelerinin desteklenmesi, biyoaktif materyalin direkt olarak hedeflenen bölgeye katkı sağlaması ile biyoyararlanımının arttırılması nedeniyle ilaç ve sağlık endüstrisinde daha fazla ilgi görmektedir (Ezhilarasi, Karthik, Chhanwal ve Anandharamakrishnan, 2013; Ghosh ve diğerleri, 2021). Dolayısıyla biyoaktif bileşenlerin salınımı başladığı zaman kademeli olarak salınarak daha kalıcı etki göstermeye başlarlar (Niño-Vásquez, Muñiz-Márquez, Ascacio-Valdés, Contreras-Esquivel, Aguilar, Rodríguez-Herrera ve Flores-Gallegos, 2022). Hidrofobik yapıdaki biyoaktif bileşenlerin kapsüllenmesi için nanoenkapsülasyon teknolojisi kullanılarak, bu kapsamda nanojeller, nanofiberler, nanolipozomlar, inklüzyon kompleksleri geliştirilmektedir (Ezhilarasi ve diğerleri 2013; Ghosh ve diğerleri, 2021). Küçük boyutları nedeniyle nanokapsüller akışkanlar içerisinde kolaylıkla homojen bir şekilde dağılabilir. Aynı zamanda aktif bileşiğin etkisi mikrokapsüllere göre daha hızlı başladığından daha fazla salınım gösterirler ve daha uzun dayanıklılık sağlarlar (Niño-Vásquez ve diğerleri, 2022).

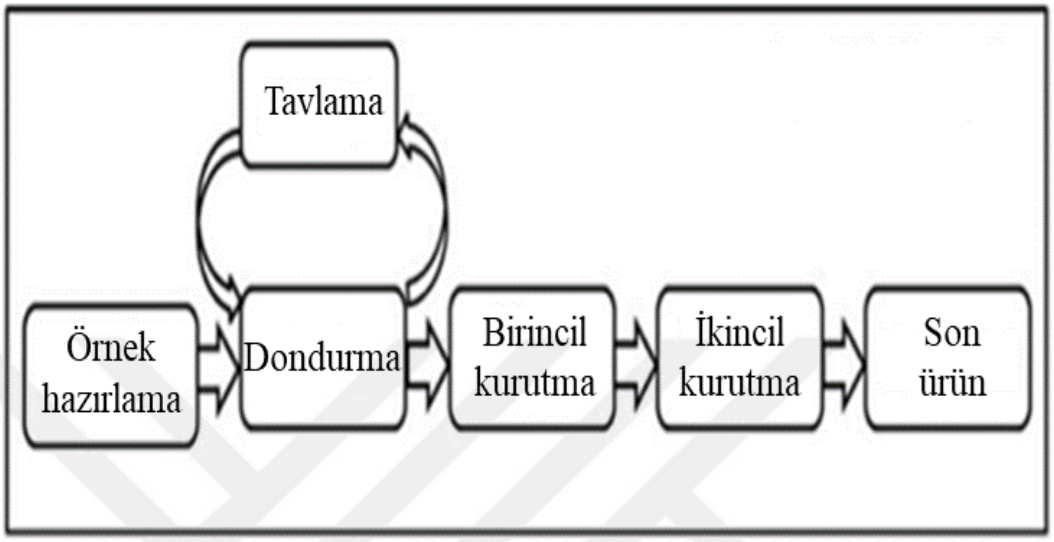
2.2.1.Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma)

Liyofilizasyon, düşük basınç ve yüksek vakum altında ısı uygulanarak buz haldeki suyun süblimleşmesi ile ortamdan uzaklaştırılması işlemidir (Gaidhani, Harwalkar, Bhambere ve Nirgude, 2015; Nowak ve Jakubczyk, 2020) (Şekil 2.5). Yöntemin temel prensibi dondurulmuş suyun sıvı hale geçmeden doğrudan buhar haline geçmesidir.

Liyofilizasyon;

1. Suyun dondurulması
2. Sübliminasyon (birincil kurutma) ve
3. Desorpsiyon (ikincil kurutma) olmak üzere 3 aşama ile gerçekleşmektedir.

Liyofilizasyon farmasötik alanlarda devamlılığı olan ve enkapsülasyon işlemlerinde tercih edilen bir yöntemdir. Maliyeti yüksek olduğu için liyofilizasyon yönteminde en önemli adım kurutma süresinin en aza indirilmesidir (Gaidhani ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.5. Dondurarak kurutma yönteminin aşamaları (Bansal, Baheti, Kumar ve Bansal, 2010)

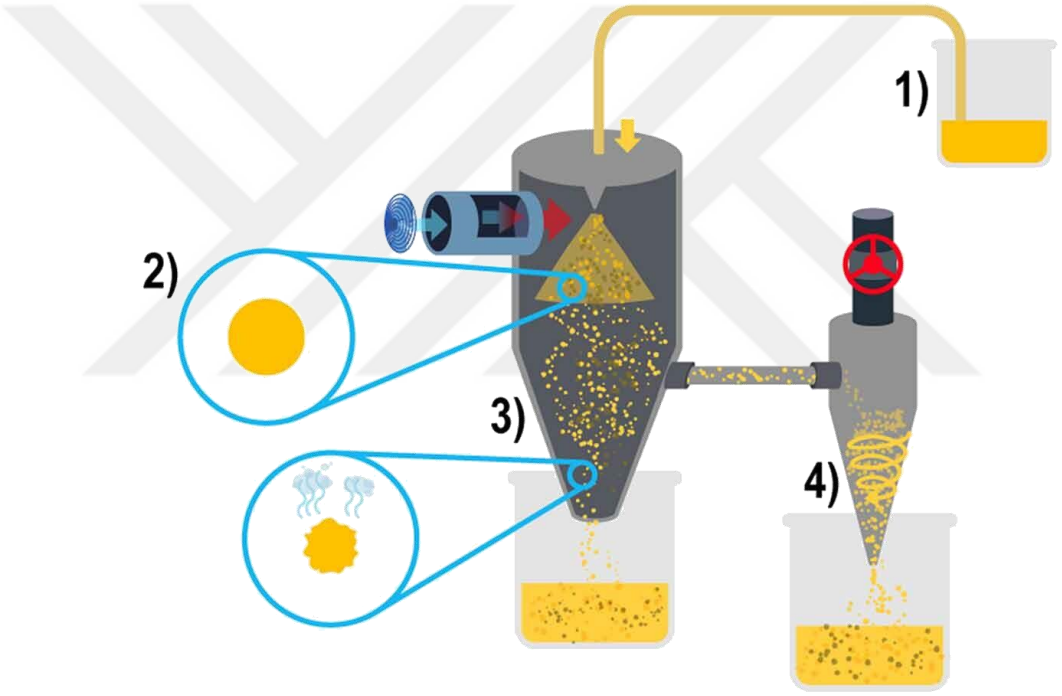
2.2.2. Püskürterek kurutma

Püskürterek kurutma yöntemi, nano ya da mikroenkapsülasyonlarda ısıya duyarlı olan biyoaktif bileşenlerin çözelti ya da süspansiyon formlarından kurutulması için başvurulan bir yöntemdir (Fernández-Quiroz, Tohidi, Paymard ve Lucero-Acuña, 2023; Prajapati ve diğerleri, 2023). Püskürterek kurutma ile enkapsülasyon çoğunlukla 100ºC ve üzerindeki yüksek sıcaklıkta mikro boyutta toz haline döndürülmesidir.

Püskürterek kurutma ile mikroenkapsülasyon,

1. Sulu çözeltinin besleme odasına yerleştirilmesi,
2. Kurutma odasında çözeltinin mikro damlacıklar haline getirilmesi,
3. Kurutma odasında dikey konumda, atomizere paralel olacak şekilde sıcak hava şartlarında mikro damlacıkların kurutulması ve
4. Elde edilen mikrokapsüllerin silikon ayırıcında toplanması

olmak üzere 4 aşamadan oluşmaktadır (Niño-Vásquez ve diğerleri, 2022) (Şekil 2.6).

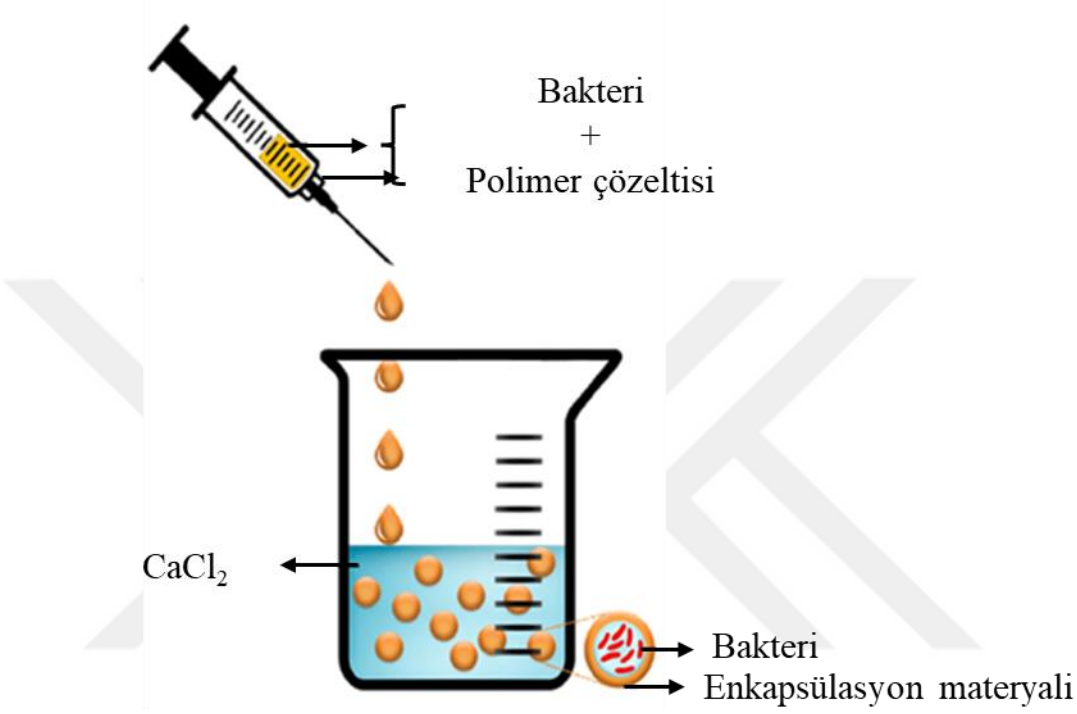


Şekil 2.6. Püskürterek kurutma yönteminin aşamaları (Niño-Vásquez ve diğerleri, 2022)

2.2.3. Ekstrüzyon

Ekstrüzyon yöntemi çoğunlukla probiyotik bakterilerin aroma içerikli bileşenler ile kapsüllenmesi için kullanılan enkapsülasyon yöntemidir. Ekstrüzyon yönteminde duvar materyali olarak hidrokolloidler (aljinat, karragenan vb.), maltodekstrin, gliserin vb. bileşenler kullanılır. Aroma içerikli uçucu bileşenlerin duvar materyalleri içerisine

kendiliğinden yavaş bir şekilde yayılması ile enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilir (Tutun ve Yurdakul, 2022). Yöntemde elde edilen mikrokapsüllerin boyutları cihazda kullanılan iğne düzeneği ve püskürtme sistemine göre belirlenmektedir (Soukoulis ve Bohn, 2018) (Şekil 2.7).

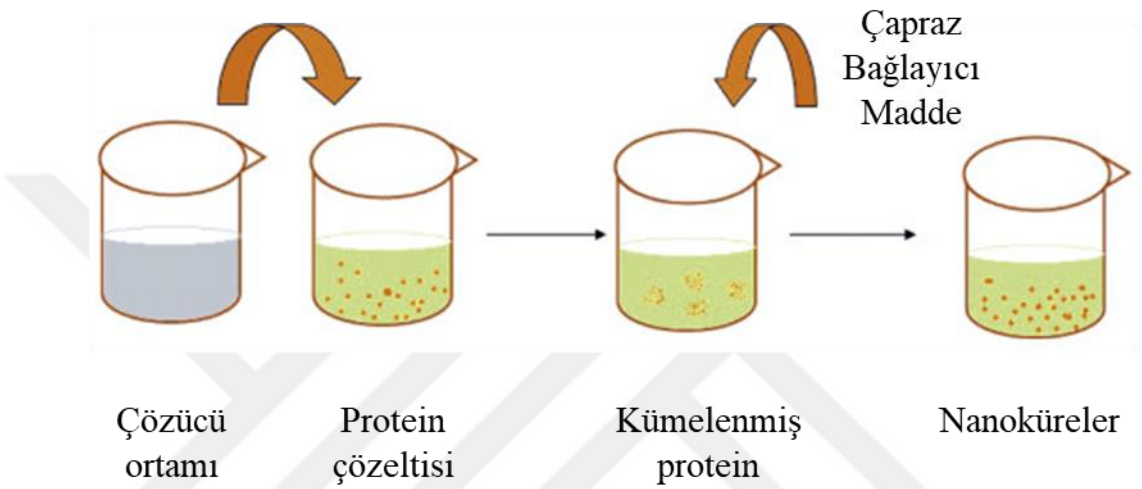


Şekil 2.7. Ekstrüzyon yönteminin uygulanması (Riseh, Skorik, Thakur, Pour, Tamanadar ve Noghabi S, 2021)

2.2.4. Koaservasyon

Koaservasyon; proteinler, polimerler ve polisakkaritler gibi karşıt yüklere sahip çözeltilerin ve/veya makromoleküllerin bir araya gelme süreci olarak tanımlanmaktadır (Tutun ve Yurdakul, 2022) (Şekil 2.8). Bu yöntemde, kullanılan polimerin moleküler ağırlığı ve miktarı kapsüllerin parçacık boyutu ve homojenliğini etkilemektedir. Enkapsülasyon yöntemi, yüklü makromoleküllerin organik bir çözücü kullanarak sıvı-sıvı ayrılmasıyla elde edilen polimer bakımından zengin fazda protein ve peptitlerin kapsüllenmesinde kullanılmaktadır (Dubey, Mody, Sharma, Agrawal ve Vyas, 2016). Kapsüllemede kullanılan duvar materyallerin sayısına bağlı olarak basit ve kompleks

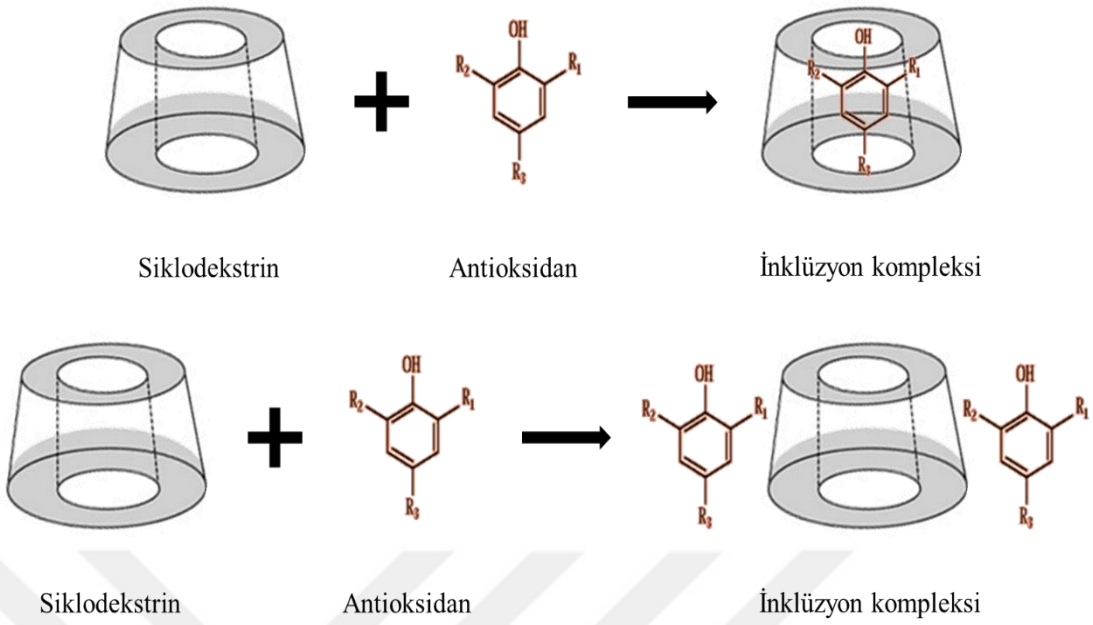
koaservasyon olmak üzere iki alt grupta incelenmektedir. Basit koaservasyon, tek bir kapsülleyici malzeme içerir ve çözeltinin dehidrasyonu yoluyla gerçekleştirilir. Mikro ve nanoenkapsülayonda kullanışlıdır. Kompleks koaservasyon ise birden fazla kapsülleyici malzeme içerir ve yüklerinin elektrostatik etkileşimi yoluyla gerçekleşir. Protein ve polisakkaritler kompleks koaservasyonda kullanılan ana bileşiklerdir (Tutun ve Yurdakul, 2022).



Şekil 2.8. Koaservasyon yönteminin uygulanması (Eghbal ve Choudhary, 2018)

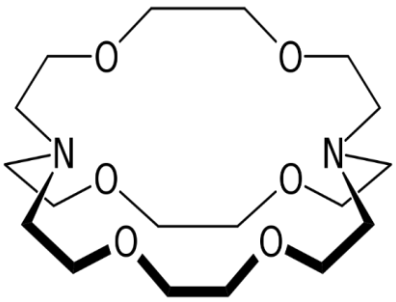
2.2.5. İnklüzyon kompleksleri

İnklüzyon kompleksleri, en temel şekilde konak moleküller ile konuk moleküllerin oluşturduğu kompleksler olarak tanımlanmaktadır. Supramoleküler kimyada ise, yapısında boşluk bulunduran konak moleküller ile iki veya daha fazla konuk moleküllerin (Mejuto ve Simal-Gandara, 2022) hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, iyonik bağlar ve Van der Waals kuvvetleri de olmak üzere kovalent olmayan etkileşimlerle (Jo, Cho ve Chun, 2021) geri dönüşümlü olarak kristal yapı oluşturması ile gerçekleşen yapılar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.9).

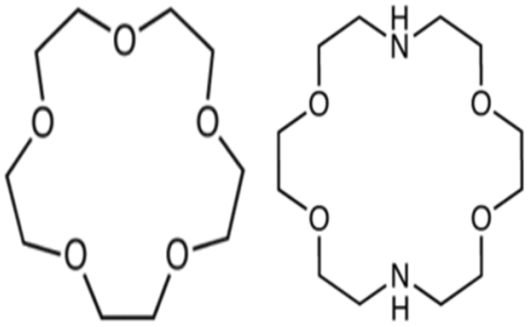


Şekil 2.9. İnklüzyon kompleksi oluşumu

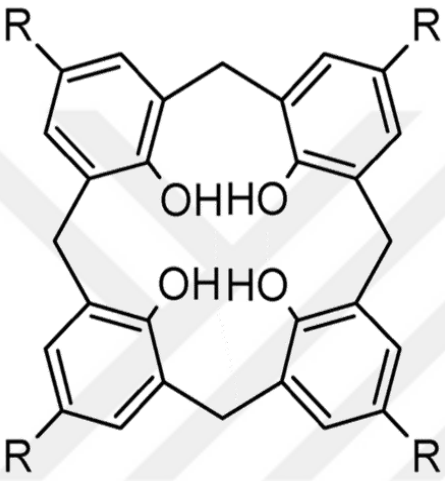
Konak moleküller konuk moleküllerin yüksek afinite ve seçiciliğine sahip konakçı reseptörleri gibi davranmasını sağlayan boşluğa sahiptir (Mejuto ve Simal-Gandara, 2022). Biyolojik aktif bileşenlerin fizikokimyasal ve spektroskopik olarak özelliklerinin konuk moleküller olarak kullanılması için özellikle nanotıp alanında inklüzyon komplekslerinin oluşumu tercih edilir hale gelmiştir (Cabrera-Quiñones, López-Méndez ve Guadarrama, 2023). Konak makrosiklik yapılar ile oluşturulan inklüzyon kompleksleri ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanılarak, komplekslerin taşıyıcı sisteme uygulanabilirliği ve taşıyıcı sistemdeki kontrollü stabilite artışı gibi daha birçok faydalı etki sağlamaktadır. İnklüzyon kompleksi oluşturmak için kullanılabilecek konak moleküllerden bir kısmı Şekil 2.10'da gösterilmiştir (Mejuto ve Simal-Gandara, 2022; Soni, Alsasa ve Rodell, 2021).



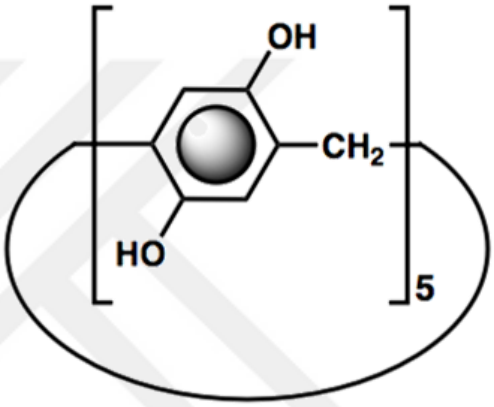
Kriptand



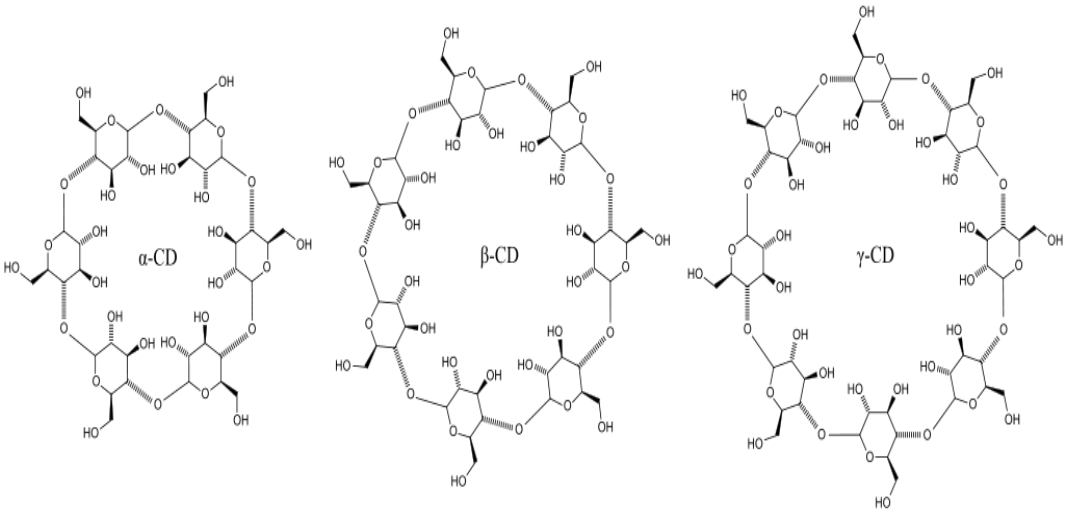
Taç Eterler (15-taç-5, aza-taç eter)



Kaliksarenler



Pillararenler



Siklodekstrinler

Şekil 2.10. İnklüzyon komplekslerinde kullanılan konak moleküller

Polar çözücülerin konak moleküllerin iç boşluğunu apolar bir ortamla terk etmesi, komplekslerin oluşması için birincil koşuldur. Hidrofobik yapıdaki konuk moleküller ortamdaki hidrofobik etkileşimlerin artması ile konak moleküllerin iç boşluğuna yayılır. İnklüzyon komplekslerin oluşumundaki en büyük etken konuk molekül ile konak moleküller arasında gerçekleşecek olan fiziksel güçtür (Bonthagarala, Rajendra Kumar, Kumar, Ashok, Nama ve Baburao, 2013). Konak molekül ile konuk molekülün etkileşime geçmesi için,

1. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon),
2. Püskürterek kurutma,
3. Katı içinde dağılma,
4. Süper kritik karbondioksit
5. Mikrodalga gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Bu yöntemler üretim sonrasında elde edilecek olan komplekslerin endüstriyel olarak hangi alanda kullanılacağına göre belirlenmektedir (Del Valle, 2004; Liu ve Guo, 2002).

Üretim sonucu elde edilen inklüzyon komplekslerinin yapısal karakterizasyonunu fiziksel olarak tespit etmek ve istenilen oran ve yüksek verimle elde edildiğini belirlemek için çeşitli karakterizasyon yöntemleri bulunmaktadır.

1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM),
2. Termogravimetrik analiz (TGA),
3. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR),
4. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR),
5. X-ışını kırınımı (XRD)
6. Taramalı diferansiyel kalorimetre (DSC) gibi karakterizasyon yöntemleri kullanılarak komplekslerin yapıları yorumlanabilmektedir.

Literatürde biyoaktif bileşenler ile siklodekstrinler arasında inklüzyon komplekslerinin oluşumu ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. de Almeida Magalhães, de Oliveira Macedo, Pacheco, da Silva, Barbosa, Pereira, Costa, Silva Junior, da Silva Ferreira, de

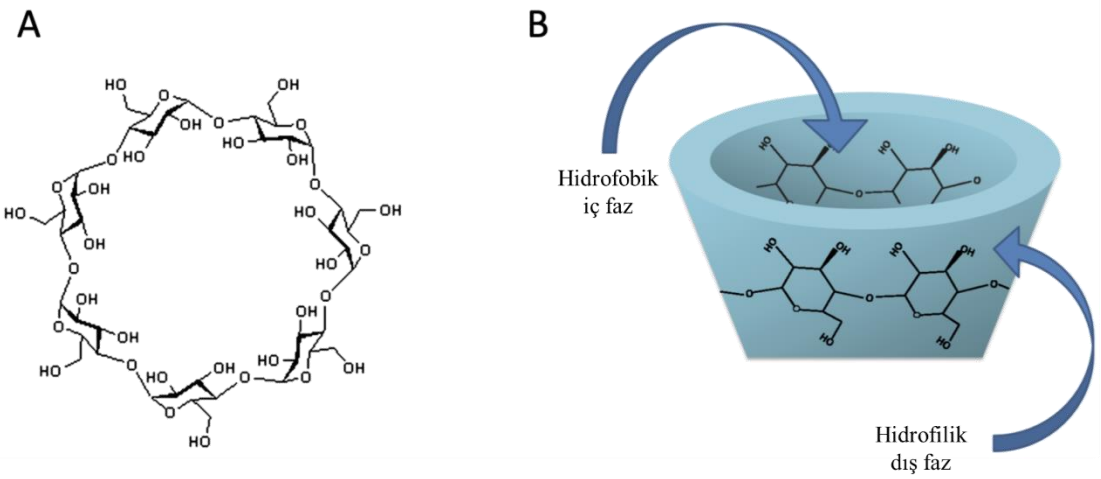
Almeida, Neto, Converti ve de Lima, 2020 tarafından yapılan çalışmada acai üzümü (*Euterpe oleracea* Mart.) yağı (EOY) ile siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin bileşiklere fizikokimyasal stabilite sağladığını ve EOY'nin biyolojik etkinliğinde herhangi bir kayıp gözlenmediği sonucuna varılmıştır. Bu doğrultuda siklodekstin-inklüzyon komplekslerinin terapötik uygulamalarda kullanılabilirliği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada iltihaplı dokularda anestezi için bir adjuvan geliştirilmesi ve bunun ilaç dağıtım sisteminde siklodekstrinlerin kullanılabilirliğinin incelenmesi amaçlanmıştır (Couto, de Oliveira-Nascimento, Cabeça, Geraldes, Costa, Riske, Franz-Montan, Yokaychiya, Dias Franco ve de Paula E, 2020). Çalışmada analjezik kapsaisin (AK) ve lokal anestezikler (LA) olmak üzere iki ilaçlı kombinasyon geliştirilip iltihaplı doku üzerindeki analjezik etkisi incelenmiştir. AK'nin hidroksipropil-β-siklodekstrin ile çözünürlüğünün yaklaşık 20 kata kadar arttığı gözlenmiştir. Ayrıca kompleksin en az 12 ay boyunca fizikokimyasal stabilite gösterdiği saptanmıştır.

İnklüzyon komplekslerinin üretiminde kullanılabilecek olan konak moleküllerden siklodekstrinler, çözünmeyen kompozitlerin çözünürlüğünü artırmak için kullanılmaktadır (Riseh ve diğerleri, 2021). Aynı zamanda siklodekstrin ile inklüzyon komplekslerinin oluşturulması basit enkapsülasyon yöntemleri olarak bilinmektedir. Konak molekül olarak siklodekstrinlerin kullanılması, konuk molekülünün stabilitesini ve sudaki çözünürlüğünü destekleyebilir, buharlaşmasını engelleyebilir ve çevreden gelebilecek dış etkenlere karşı koruma kalkanı görevi göstermektedir (Eghbal ve Choudhary, 2018). Siklodekstrinlerin (SD) dahil olduğu kompleksler oksidasyon, uçuculuk, esmerleşme reaksiyonları ve mikrobiyal kontaminasyon gibi kimyasal reaksiyonlara karşı koruma sağlar (Jo, Cho ve Chun, 2021).

2.4. Siklodekstrinler

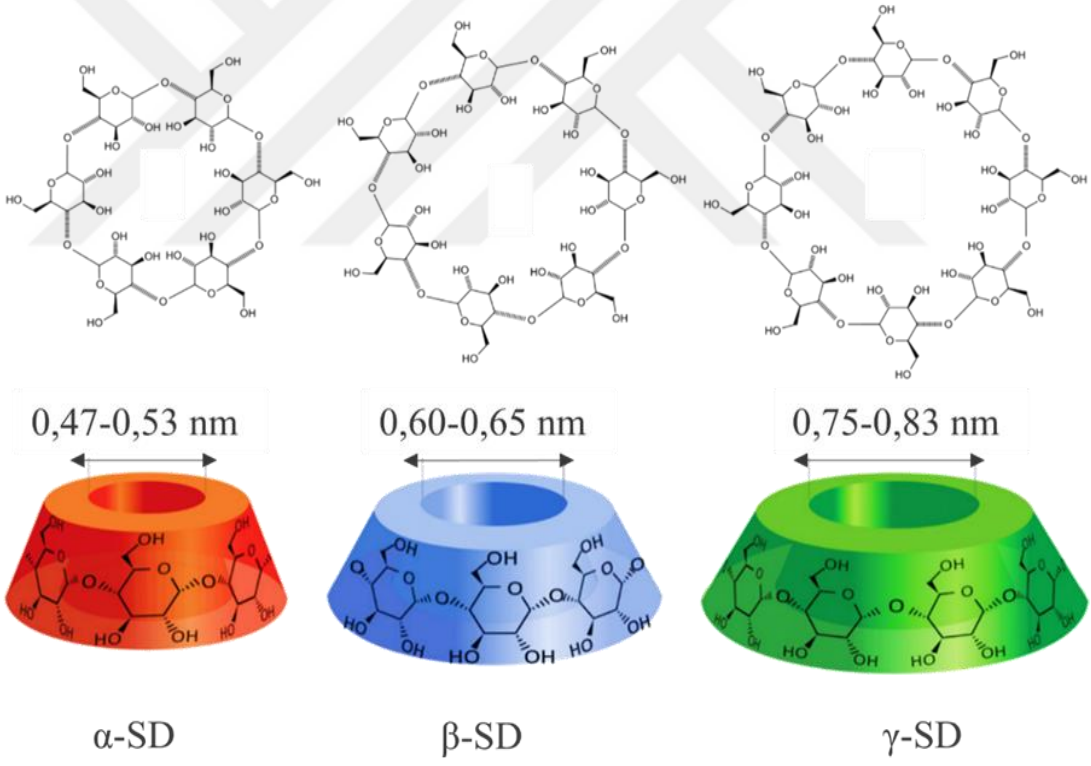
Siklodekstrinler (SD), Antoine Villers tarafından 1891'de bakterilerde patates nişastasının enzimatik olarak bozunmasının araştırılması sırasında keşfedilmiştir (Szente, Szemán ve Sohajda, 2016). Villers, asit hidrolizine direnç ve indirgeyici olmayan özellikleri ile selüloza benzeyen α ve β-SD'i izole etmiştir (Crini, 2014; Crini, 2020). İzole edilen yapıları selülozinler olarak isimlendirmiştir. Ardından Franz Schardinger ise bu yapıların isimlerini dekstrinler olarak düzeltmiş ve günümüze kadar SD'ler olarak tanınmıştır (Martin, Díaz-Montaña ve Asuero, 2018). Cramer, α, β ve γ-SD'lerin saflaştırma ve ayırma yöntemlerini araştırarak konak-konuk moleküllerin katı ve çözelti durumu üzerine birçok çalışma gerçekleştirmiştir (Jansook, Ogawa ve Loftsson, 2018).

Günümüzde SD'ler, artan kullanım çeşitliliği nedeniyle fonksiyonel adjuvanlar olarak bilinmektedir (Bonthagarala ve diğerleri, 2013). SD'ler, polisakkaritlerin en temel üyesi olan nişastanın enzimatik parçalanması ile oluşan doğal maddelerdir. Altı, yedi ve sekiz glukoz biriminden oluşan (Feng, Chen, Li, Gu, Xu, Ban, Hong, Cheng ve Li, 2023) ve kafes molekül yapısına (lipofilik boşluğa sahip amfifilik yapı) sahip olan (Crini, 2014) siklodekstrinlerde hidroksil gruplarının düzenlenmesi nedeniyle (Ho, Keijiiterao ve Bhandarii, 2021) kafesin iç fazı hidrofobik, dış fazı ise hidrofilik özellik göstermektedir (Agrawal & Gupta, 2012) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Siklodekstrin yapısı (Escobar, Garrido-Miranda, Pulido, Naveas, Manso-Silván ve Hernandez-Montelongo, 2023)

α, β ve γ-SD'lerin çapları (Şekil 2.12), glikopiranoz birimlerinin sayısına bağlıdır. Altıdan az glikopiranoz birimine sahip SD'ler sterik engelleme nedeniyle oluşamazken, dokuz ve/veya daha fazla glikopiranoz birimine sahip siklodekstrinlerin saflaştırılması zordur (Esteso ve Romero, 2024). SD'ler toksik olmama özelliği ile bilinen bileşenlerdir (Pandey, Shukla, Dhote, Mishra, Maheshwari ve Tekade, 2018). Su, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetil formamid (DMF) gibi organik yapılı çözücülerde çözünebilen şeker yapılı polimerlerdir. Doğal SD'ler düşük pH ortamlarında asit hidrolizine duyarlıdır ve dolayısıyla halka yapısının açılmasına ve çeşitli glikoz birimlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Ancak alkali koşullarda (pKa = 12,1-13,5) SD'lerin yüksek stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir (Saokham, Muankaew, Jansook ve Loftsson, 2018). α, β ve γ-SD'lerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.2'de (Zhou, Jia, He, Li ve Cai, 2022) listelenmiştir.



Şekil 2.12. Siklodekstrin türevleri Erişim Tarihi: 29.09.2023 (https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin; https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mabi.202200090)

Çizelge 2.2. Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal Özellikler	α-Siklodekstrin	β-Siklodekstrin	γ-Siklodekstrin
Glikopiranoz birimi	6	7	8
Kimyasal formülü	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{45}$
Molekül ağırlığı (g/mol)	972	1135	1297
Hidrofobik boşluk çapı (nm)	0,57	0,78	0,95
Hidrofilik faz çapı (nm)	1,4-1,5	1,5-,6	1,7-1,8
Erime noktası (ºC)	275	280	275
pKa (25ºC)	12,3	12,2	12,1
İç su molekülleri	6-8	11-12	13-17
Çözünürlük (mg/mL, 25ºC)	145	18,5	232

Her bir glikopiranoz biriminin ikincil hidroksil grupları arasındaki molekül içi hidrojen bağı, SD'lerin yapısal esnekliğinde ve suda çözünürlüğünde önemli bir rol oynar. β-SD, molekül içi hidrojen bağı kuşağının oluşumu nedeniyle tüm SD'ler arasında en katı yapıya sahiptir. Daha az glikopiranoz birimine sahip olan α-SD, molekül içi hidrojen bağı kuşağının kesikli olmasından dolayı β-SD'den daha esnektir. γ-SD yapısal olarak en esnek olan siklodekstrin türevidir ve bu nedenle üç SD türevi arasında çözünürlüğü en yüksek olandır (Ho ve diğerleri, 2021).

SD'ler sabit bir erime noktasına sahip olmamakla birlikte asidik ve alkali ortama ve ısıya karşı dirençli biyomoleküllerdir. SD'ler organik tuzlar ve nötr/inorganik moleküllerle kompleks oluşturabilirler. Ayrıca daha az çözünen ilaçların/biyoaktif maddelerin kompleksleşmesi için de kullanılırlar (Matencio, Navarro-Orcajada, García-Carmona ve López-Nicolás, 2020). SD'ler, oluşturacakları inklüzyon kompleksleri sayesinde

hidrofobik konuk moleküllerin kontrollü salınımı ve ilaç, kozmetik gibi endüstriyel uygulamalar için fiziksel ve kimyasal özelliklerini (uçuculuk, çözünürlük vb.) değiştirebilirler (Feng ve diğerleri, 2023; Kong, Su, Zhang, Qin ve Zhang, 2019). Hidrofobik konuk moleküllerin inklüzyon komplekslerinden salınımı yavaş ve hedefli salınım şeklinde gerçekleşebilir. Gastrointestinal sistemlerde konuk molekülün inklüzyon komplekslerinden kademeli olarak salınması yavaş salınım olarak bilinir. Hedefli salımda ise konuk molekül etkili olduğu bilinen bölgeye salınarak biyoyararlanımı artırır ve inaktif bölgelerde bağlanmanın neden olduğu hasarı en aza indirir (Feng ve diğerleri, 2023).

SD'ler ilaç bileşenleri, biyoaktif maddeler ile kompleks oluşturması, kapsülleme kapasitesi ve düşük maliyet vb. nedenlerle tıp, farmakoloji, tekstil, biyoteknoloji gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Crini, 2014; Morin-Crini, Fourmentin, Fenyvesi, Lichtfouse, Torri, Fourmentin ve Crini, 2021). Aynı zamanda suda çözünürlüğü düşük olan maddelerin çözünürlüğü ve biyoyararlanımında kontrollü salım sistemlerinde katalizör olarak kullanılmaktadır (Bai, Tian, Zhao, Huang ve Wang, 2017; Bonthagarala ve diğerleri, 2013).

2.5. *Pinaceae* (Çamgiller)



Şekil 2.13. *Pinaceae*
(Erişim Tarihi: 01.04.2024, https://gobotany.nativeplanttrust.org/family/pinaceace)

Pinaceae (Şekil 2.13) nadir olmakla beraber çalılardan oluşan reçineli yapıya sahiptir. Çamgiller (*Pinaceae)* familyası ektomikorizal yapıda bir köke, basit, iğnemsi yapıda ve dökümü olmayan yapraklara, küçük polen kozalaklarına ve her biri genellikle iki adaksiyal, ters ovül/tohum taşıyan odunsu, ovulifer pullu tohum kozalaklarına sahip olmalarından dolayı ayırt edicidir. *Pinaceae* familyasının *Abies* (göknar: 4 tür), *Cathaya* (1 tür), *Cedrus* (sedir: 2-4 tür), *Hesperopeuce* (*Tsuga*) (1 tür), *Larix* (karaçam: 10 tür), *Nothotsuga* (1 tür), *Picea* (ladin: 34 tür), *Pinus* (çam: 110 tür), *Pseudolarix* (altın karaçam: 1 tür), *Pseudotsuga* (douglas göknarı: 4 tür) ve *Tsuga* (baldıran: 9 tür) olmak üzere 12 cinsi bulunmaktadır. *Pinaceae* familyası genellikle kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde dağılım göstermektedir. *Pinaceae* familyasına ait ağaçlar, koku ve tıbbi yağlar, gıda ve endüstri alanlarında, kağıt üretiminde odun hamuru olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Simpson, 2019). Gıda sektörü incelendiğinde *Pinaceae* familyasının esas olarak kıtlık yiyeceği olarak tanımlandığı bilinmektedir (Valerón, Vásquez ve Munk,

2021). *Pinaceae* familyasının kapsadığı ağaçların iç kabuklarının yenilebilir, pişirilebilir olduğu, toz halindeyken kıvamlaştırıcı olarak çorbalara katıldığı ve tahıllarla karıştırılarak ekmek yapımında kullanıldığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ekiz, 2023).

2.6. *Pinus brutia* Ten. (Kızılçam)

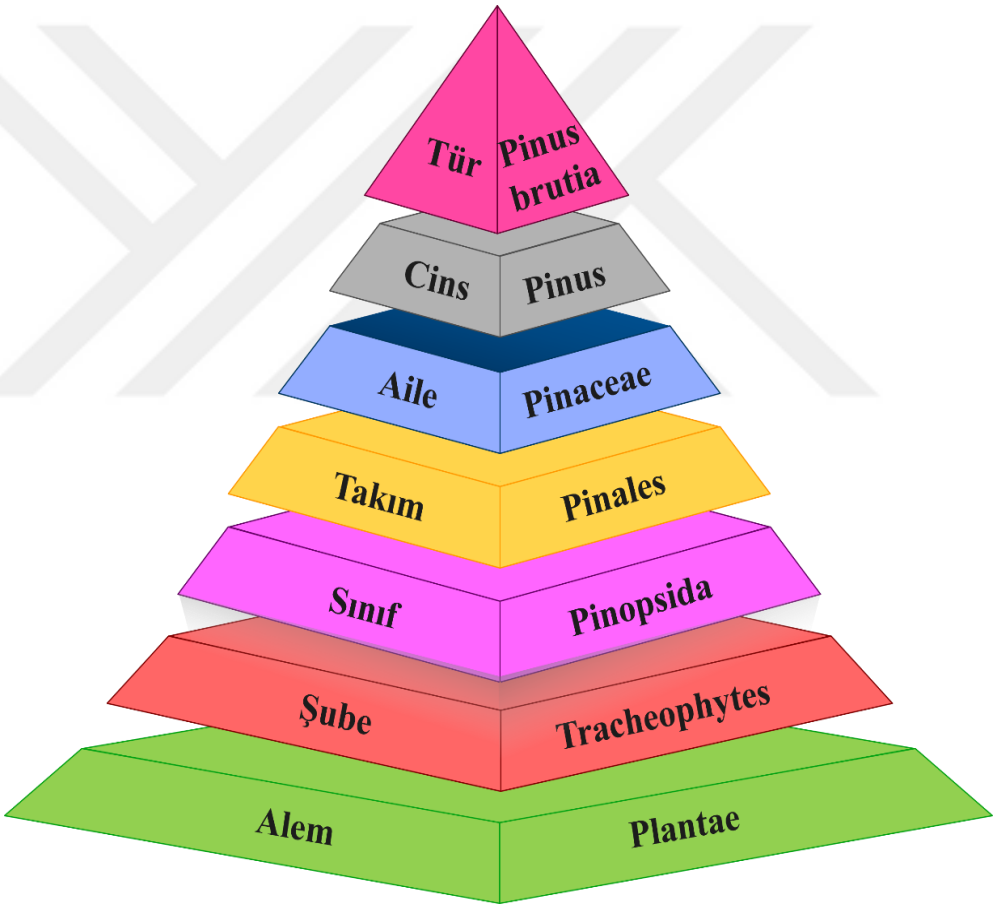
Pinus brutia (Şekil 2.14) bitkisel kaynakların içeriği ve bileşenleri tıbbi/aromatik özellikler açısından büyük önem taşımaktadır. Çeşitli hastalıkların ortaya çıkması ile bitkilerin tedavi amaçlı kullanımına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Gıda olarak tüketilebilen ve ticari ürüne dönüştürülebilen orman bitkileri başta olmak üzere bu bitkisel kaynaklardan elde edilen ürünlerin çeşitliliği günümüzde giderek artmaktadır. *Pinus* türlerinden elde edilen ekstraktların terpenoid, steroid, proantosiyanidin ve flavonoid içerdiği bilinmektedir. Bu bileşiklerin anti-bakteriyel, anti-fungal, yara iyileştirici ve antioksidan özellikleri bulunmaktadır (Kivrak, Kivrak, Harmandar ve Çetintaş, 2013).



Şekil 2.14. *Pinus brutia* Ten. kabuk ve toz hali

Coğrafi olarak en geniş yayılışa sahip çam türleri olan *Pinus brutia* ve *Pinus nigra* Türkiye'de (Kuzey Anadolu ve Toroslar) 400–2100 m rakımlarda yer almaktadır. *Pinus brutia* Ten.'e ait taksonomi Şekil 2.15'te belirtilmiştir. Bu çam türlerinin en belirgin özelliği, diğer çam çeşitlerinin yetişemediği veya iyi gelişemediği yerlerde yetişmesidir. Çamgiller familyasına ait bitkilerin yaprakları, kozalakları ve reçinelerinin çam yetiştirilen bölgelerde birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir.

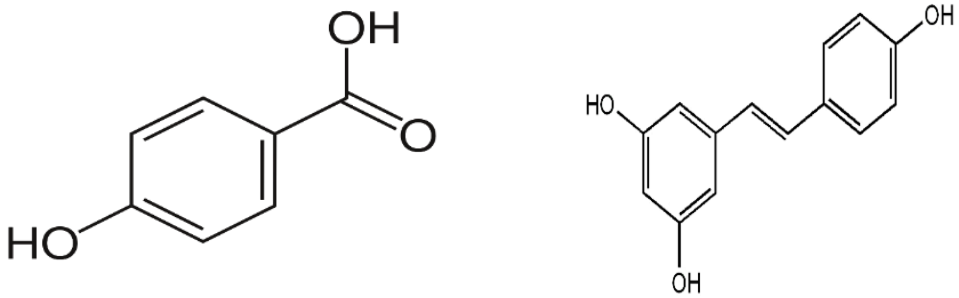
Özellikle Doğu Asya ülkelerinde çam ağaçlarının çam iğneleri, kozalakları, korteksleri ve polenleri gibi farklı birçok bölümleri insan sağlığını olumlu yönde desteklemek ve iyileştirmek için gıda yahut besin takviyesi olarak yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Çam ağacının bölümlerinin tüketilmesinin gastrointestinal kaynaklı hastalıkları ve nöron problemlerini olumlu yönde etkilediği belirtilirken, yüksek tansiyon, damar sertliği ve şeker hastalığı gibi kronik hastalıkları önlediğine inanılmaktadır. *P. brutia* ve *P. nigra*'nın fenolik bileşiminin *P. sylvestris* ve *P. pinea*'dan önemli ölçüde yüksek olduğu ve *P. brutia*'nın diğer çeşitlere göre (%18,5) daha yüksek taksifolin içeriğine sahip olduğu belirtilmektedir (Kivrak ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.15. *Pinus brutia* Ten. taksonomisi

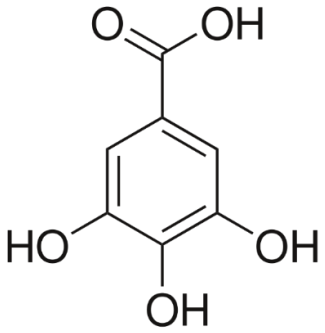
Türkiye'nin Akdeniz, Ege ve Karadeniz bölgelerinde doğal olarak yetişen *P. bruita,* toplam Türkiye orman alanının %25'ini kaplamaktadır ve bu nedenle kabuğu, ağaç işleme endüstrisinde bir atık malzeme olarak büyük bir potansiyele sahiptir. *P. brutia* kabuğu,

başta tanenler, flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere antimikrobiyal fenolik bileşikler açısından zengindir (Ucar, Ucar, Pizzi ve Gonultas, 2013). *Pinus brutia* Ten. reçinesi Türkiye'de halk arasında sakız olarak tüketildiği için çam sakızı olarak isimlendirilmektedir. Çam sakızının antiseptik, şeker seviyesini dengeleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Osmanlıda çam sakızlarının tümörlü hücrelerin iyileştirilmesinde kullanılan karışımlarda da kullanıldığı bilinmektedir. *Pinus brutia* reçinesinin yapay tükürük çözeltisindeki sitotoksisite analizleri gerçekleştirilerek çam sakızının hepatoprotektif özelliğinin olduğu tespit edilmiştir (Ertaş, Dönmez, Konyalıoğlu ve Sogut, 2018). Aynı zamanda kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) polenlerinin karaciğer hastalıklarının tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir (Gök, Gül, Güfraz, Asad, Öztürk, Şanal ve Orhan, 2021). Bitki kabuğunda bulunan reçine özellikle apseleri tedavi etmek ya da ağrıyı gidermek gibi tıbbi amaçlar için kullanılır (Dıg ve Hakkı Alma, 1999). *P. brutia* kabuğu özlerinin *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus auerus*, *Mycobacterium smegmatis* gibi gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonicea* gibi gram (–) bakterilere karşı etkisiz olduğu yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır. Ayrıca farklı çam türlerinden elde edilen kozalakların anti-bakteriyel, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-tümör aktivitelere sahip fenolik bileşikler ve polisakkaritler gibi çeşitli biyoaktif maddelere sahip olduğu belirtilmiştir (Kivrak ve diğerleri, 2013) (Şekil 2.16).

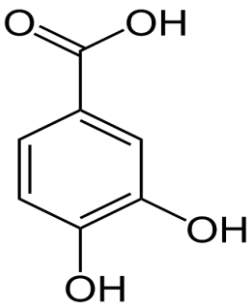


4-hidroksibenzoik asit Resveratrol

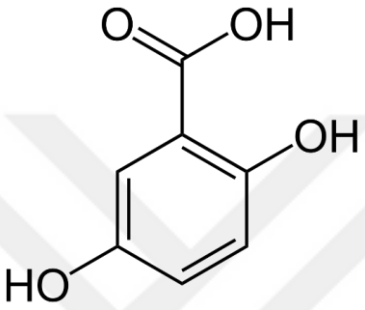
Şekil 2.16. *Pinus brutia* Ten. içeriğinde bulunan fenolik bileşenler



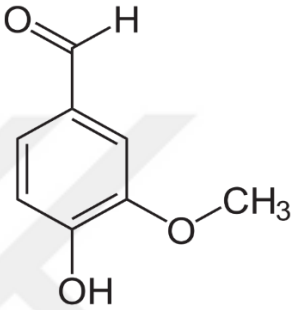
Gallik asit



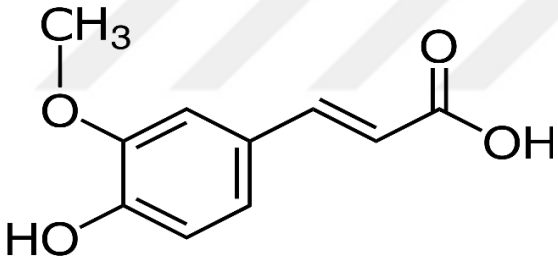
Protokatekuik asit



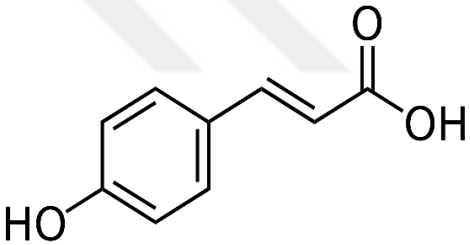
Gentisik asit



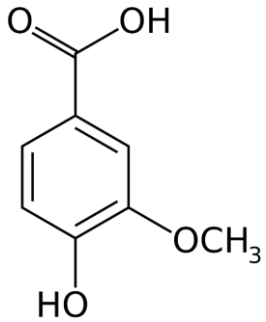
Vanilin



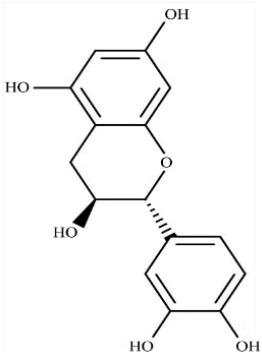
Ferulik asit



p-kumarik asit



Vanilik asit



Kateşin hidrat

Şekil 2.16. *Pinus brutia* Ten. içeriğinde bulunan fenolik bileşenler (devam)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kızılçam kabuklarının toplanması

Kızılçam kabukları (KÇK) Türkiye'nin Bursa ilinin Altınova-Osmangazi ilçesinden (40°13'53.5"-29°03'49.0") temin edilmiştir. Toplanan KÇK oda koşullarında kurutulmuştur. Kurutulan KÇK bir öğütücü yardımıyla toz haline getirilerek homojenize edilmiş ve kullanılana kadar +4ºC'de saklanmıştır.

3.1.2.Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Tez Çalışmaları kapsamında çalışmalarda kullanılan cihazlar, cihazların özellikleri (Marka/Model) ve kullanım amaçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve amaçları

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
Analitik Terazi	Mettler Toledo, MS105DU (± 0,00001 g)	KÇK ekstraktının hazırlanması ve tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
Çoklu Manyetik Karıştırıcı	MS-MP8, Wisd	Tez çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Evaporatör (Döner Buharlaştırıcı)	Bibby Scientific, RE 100	KÇK ekstraktlarının çözücülerinin uçurulmasında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve amaçları (devam)

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)	Pelkin Elmer, Spectrum 100	KÇK'nın ve KÇK–β–SD enkapsülatlarının yapı analizlerinde kullanılmıştır.
HPLC-DAD (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diod Serili Dedektör)	Agilent Technologies, 1200 Series	KÇK'dan hazırlanan ekstraktların fenolik madde içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Are, Velp	Tez çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
İnkübatör	Nüve S500	Probiyotik bakterileri kültürlerinin aktive edilmesi, geliştirilmesi ve mikrobiyolojik analizleri için kullanılmıştır.
Liyofilizatör	Labconco,FreeZone 2,5 Plus	KÇK'dan hazırlanan ekstraktların liyofilizasyonu için kullanılmıştır.
Nükleer Manyetik Rezonans	Agilent 400/54	β-SD-metakrilat ve β–SD örneklerinin karakterizasyonunda kullanılmıştır.
Otoklav	Nüve, SteamArt, OT 40L	KÇK'nın mikrobiyoloik aktivitesinin incelenmesi için gerekli çözelti ve malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
pH metre	Hanna, HI 221	Çalışmalarda kullanılan *in-vitro* gastrointestinal ortamların pH ayarlamalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve amaçları (devam)

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
Saf Su Cihazı	Elga Purelab, Option Q DV25	Çalışmalarda kullanılan ultra saf su ve saf su temini için kullanılmıştır.
Santrifüj	Hermle, Z 206 A	KÇK'dan hazırlanan ekstraktların spektroskopik ve kromatografik analizleri öncesinde kullanılmıştır.
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	Hitachi TM3030Plus Tabletop Microscope	KÇK–β–SD enkapsülatının morfolojik analizleri ve kapsül boyutlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.
Sıcaklık Programlı Çalkalayıcı	Mikrotest, MCI 55 D	KÇK–β–SD enkapsülatının *in-vitro* gastrointestinal analizlerinde kullanılmıştır.
Ultrasonik Destekli Su Banyosu	ISOLAB, 621.06.003	KÇK'dan hazırlanan ekstraktlarının ve KÇK–β–SD enkapsülatının hazırlanmasında kullanılmıştır.
UV-GB Spektrofotometresi	Varian, Cary 50 Conc	KÇK'dan hazırlanan ekstraktların toplam fenolik madde, antioksidan kapasite, toplam flavonoid ve kondanse tanen değerlerinin spektroskopik olarak belirlenmesinde kullanılmıştır.
Vorteks Karıştırıcı	Wisd, VM-10	KÇK'dan ekstraktların hazırlanmasında ve ekstraktların spektroskopik analizlerinde kullanılmıştır.

3.1.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Tez Çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	**Marka**	**Katalog Numarası**
1-propanol	Merck	100996
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888
Alüminyum klorür hekzahidrat	Merck	101084
Amonyak	Sigma-Aldrich	05003
Amonyum demir (II) sülfat hekzahidrat	J.T. Baker	0118
Amonyum karbonat	Sigma-Aldrich	11204
Aseton	Sigma-Aldrich	32201
Asetonitril	ISOLAB	901037
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich	209198
Bütanol	Sigma-Aldrich	101990
Epigallokateşin	Extrasynthese	0979 S
Epigallokateşin gallat	Extrasynthese	0981 S
Epikateşin	Extrasynthese	0977 S
Epikateşin gallat	Extrasynthese	0978 S
Etanol	Merck	100983
Folin&Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Formik asit	Merck	100264
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Hekzan	Merck	104391
Hesperidin	Sigma-Aldrich	247588
Hidroklorik asit	Merck	K42350786
Kalsiyum klorür	Merck	1133055B
Kateşin	Extrasynthese	0976 S
Kuersetin	Sigma-Aldrich	Q4951

Çizelge 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar (devam)

Kimyasal Adı	**Marka**	**Katalog Numarası**
Lactobacillus acidophilus	DSMZ	DSM 20079
Lacticaseibacillus casei	DSMZ	DSM 20011
Magnezyum klorür hekzahidrat	Sigma-Aldrich	105833
Metakriloil klorür	Fluka	920-46-7
MRS Agar	Biokar BK089HA	Biokar BK089HA
MRS Broth	Biokar BK070HA	Biokar BK070HA
N,*N*-dimetilform amid	J.T. Baker	7156
Pankreatin	Sigma-Aldrich	P3292
Pepsin	Sigma-Aldrich	77160
Potasyum di-hidrojen fosfat	ISOLAB	960066
Potasyum klorür	AFG Bioscience	146629
Potasyum peroksidisülfat	Merck	105091
Proantosiyanidin A2	Sigma-Aldrich	28660
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich	08992
Sodyum asetat	Merck	106265
Sodyum bikarbonat	ISOLAB	969103
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	795429
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	791768
Sodyum klorür	TEKKİM	170540
Sodyum nitrit	Merck	106544
Sodyum potasyum tartarat	Sigma-Aldrich	217255
Toluen	Merck	108323
Trimetilamin	Merck	808352
Troloks	Sigma-Aldrich	238813
α-amilaz	Sigma-Aldrich	10069
β-siklodekstrin	Sigma-Aldrich	779105

3.1.3. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler

Tez Çalışmaları kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve özellikleri Çizelge 3.3 'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası	Özellikleri
AnaeroGen	Thermo Scientific	AN0025A	2,5 L
Otomatik pipet	Eppendorf	Z683809	10–100 µL
Otomatik pipet	Eppendorf	Z683825	100–1000 µL
Otomatik pipet	Eppendorf	Z683833	500–5000 µL

3.1.4. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler

Toplam fenolik madde analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Lowry A çözeltisi: 1 M NaOH (4 g) ve %2 (w/v) Na_2CO_3 (2 g) olacak şekilde saf su ile çözülerek 100 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanmıştır.
- Lowry B çözeltisi: %1 (w/v) $NaKC_4H_4O_6$ (1 g) ve %0,5 (w/v) $CuSO_4$ (0,5 g) olacak şekilde saf su ile çözülerek 100 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanmıştır.
- Lowry C çözeltisi: Hazırlanan Lowry A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılmış ve analizler yapılana kadar +4ºC'de saklanmıştır.
- Folin-Cioalteu çözeltisi: 2N Folin-Ciocalteu reaktifi 1:3 oranında saf su ile seyreltilerek analize hazırlanmıştır.
- Gallik asit çözeltisi (1000 mg/L): 0,1 g gallik asit standardı metanol içerisinde çözülüp 100 mL'lik balon jojede tamamlanmıştır. Stok olarak hazırlanan gallik asit çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ara stok çözeltileri hazırlanmıştır.

ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Stok ABTS radikal çözeltisi: 7 mM ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (0,092 g) ve 2,45 mM $K_2S_2O_8$ (0,01655 g) reaktiflerinin saf su içerisinde çözülerek 25 mL'lik çözeltisi hazırlanmış ve 24 sa karanlık ortamda bekletilmiştir.
- ABTS radikal çözeltisi ($ABTS^{\cdot}$): Karanlık ortamda 24 sa bekletilen stok ABTS çözeltisi 1/10 oranında saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Troloks çözeltisi (1000 mg/L): 0,1 g troloks metanol içerisinde çözülüp 100 mL'lik balon jojede hacmi tamamlanmıştır. Stok olarak hazırlanan troloks çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ara stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Toplam flovanoid analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- $NaNO_2$ çözeltisi (%5; w/v): 5 g $NaNO_2$ saf su ile çözülüp 100 mL hacme tamamlanmıştır.
- $AlCl_3$ çözeltisi (%10; w/v): 10 g $AlCl_3.6H_2O$ saf su ile çözülüp 100 mL hacme tamamlanmıştır.
- NaOH çözeltisi (1 M): 4 g NaOH saf su ile çözülüp 100 mL hacme tamamlanmıştır.
- Kateşin çözeltisi (1000 mg/L): 0,1 g kateşin metanol ile çözülüp 100 mL hacme tamamlanmıştır. Gerekli seyreltmeler metanol çözücüsü kullanılarak yapılmıştır.

Kondanse tanen analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- HCl çözeltisi (2 M): 100 mL balon joje içerisinde bulunan bir miktar saf su üzerine 17,3250 mL stok HCl çözeltisi eklenmiş ve saf su ile çözelti toplam hacmine tamamlanmıştır.
- *n*-bütanol:derişik HCl çözeltisi: Analiz boyunca gerekli olacak miktarda 95:5 oranlarında çözelti hazırlanmıştır.
- $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$ çözeltisi: 10 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$ katısı 2 M HCl ile çözülüp 25 mL hacme tamamlanmıştır.

Kromatografik analizler için kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

- Kızılçam kabuklarından elde edilen ekstraktların fenolik madde içeriklerinin kantitatif analizi için stok fenolik bileşiklerin 100 mg/L'lik (1 mg/10 mL metanol) konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden kalibrasyon grafiklerinin çizilebilmesi için 2–10 mg/L konsantrasyon aralıklarında gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

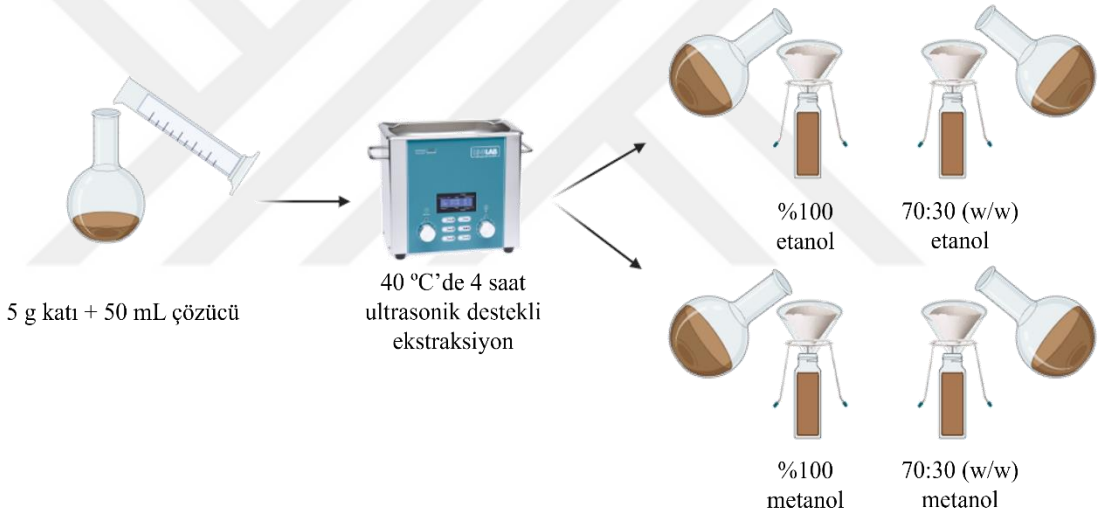
In-vitro gastro-intestinal analizler için simüle ağız sıvısı (SSF), simüle mide sıvısı (SGF) ve simüle bağırsak sıvısı (SIF) ortamlarının hazırlanması

- SSF ortamı: 1,865 g KCl (%37,3–50 mL), 6,8 g KH_2PO_4 (%68–100 mL), 21 g $NaHCO_3$ (%84–250 mL), 0,61 g $MgCl_2.H_2O$ (%30,5–20 mL), 0,48 g $(NH_4)_2CO_3$ (%48–10 mL) maddeleri saf su ile çözülerek SSF ortamı için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir örneğin SSF ortamındaki salımının belirlenmesi için 3,5 mL SSF çözeltisi, 0,5 mL α-amilaz, 25 µL $CaCl_2$ ve 975 µL saf su ile SSF ortamı elde edilir. Ortam pH'si 0,2 N NaOH ve 0,2 N HCl ile 7,0±0,2'ye ayarlanmıştır. SSF ortamı analizlerden önce 0,45 µm filtreden geçirilmiştir.
- SGF ortamı; NaCl (1 g) ve pepsin (1,6 g) saf su içerisinde çözülerek toplam 500 mL olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. 0,2 N HCl kullanılarak dikkatli bir şekilde pH 2,0±0,2'ye ayarlanmıştır. SGF ortamı analizlerden önce 0,45 µm filtreden geçirilmiştir.
- SIF ortamı: KH_2PO_4 (3,4 g), 0,2 N NaOH (38,5 mL), pankreatin (0,625 g) ve safra tuzu (1,5 g) saf su içerisinde çözülerek toplam hacim 500 mL olacak şekilde simüle bağırsak sıvısı hazırlanmıştır. Ortam pH'si 0,2 N NaOH ve 0,2 N HCl kullanılarak dikkatli bir şekilde 7,0±0,2'ye ayarlanmıştır. SIF ortamı 0,45 µm filtreden geçirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kızılçam kabuklarının (KÇK) ekstraksiyon işlemi

KÇK'nın fenolik bileşik profilinin ve antioksidan kapasite değerinin belirlenmesi için 5 g KÇK 50 mL çözücü içerisinde ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemi ile 40°C'de 4 sa boyunca ekstrakte edilmiştir (Karkar, Şahin, Bekiz, Akça ve Özakın, 2023). Ekstraksiyon işleminde çözücü olarak %100 etanol, %100 metanol, etanol-su (70:30, %v/v) ve metanol-su (70:30, %v/v) karışımları kullanılmıştır. Ekstraksiyon süresinin sonunda elde edilen ekstraktlar filtre kâğıdı kullanılarak süzülmüş ve bir numune şişesinde +4°C'de saklanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. KÇK çözücü ekstraksiyonunun şematik gösterimi

3.2.2. KÇK ekstraktlarında bulunan fenolik maddelerin analizi

Kromatografik analizlerle KÇK ekstraktlarının fenolik bileşik profillerini belirlemek için otomatik örnekleyici, çift pompa sistemi, degazer, dolgulu kolon ve diyot serili dedektörden oluşan bir Agilent 1200 serili HPLC sistemi kullanılmıştır. Analiz boyunca kullanılan HPLC-DAD cihazının çalışma koşulları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC-DAD çalışma koşulları

Parametreler	**Koşullar**
Kolon	XBridge® C18 (4,6 × 250 mm, 3,5 µm)
Akış hızı	0,5 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	37 dk
Mobil faz	%1'lik formik asit (A) – asetonitril (B)
Mobil faz sistemi	Gradient elüsyon: 0–10 dk : %13 B, 10-20 dk : %41,5 B, 20-25 dk : %70 B, 25-35 dk : %10 B
Dalga boyu	260 – 280 – 320 – 360 nm

Çizelge 3.4'te belirtilen çalışma koşulları kapsamında KÇK ekstraktlarının ve kantitatif tayin için gerekli olan standart fenolik maddelerin kromatografik analizleri gerçekleştirilmiştir (Karkar ve diğerleri, 2023). Elde edilen kromatogramlar doğrultusunda KÇK ekstraktlarının fenolik madde profili kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmiştir.

3.2.3. Spektroskopik analizler

Toplam fenolik madde analizi

KÇK ekstraktlarının toplam fenolik madde (TFM) miktarları Folin-Ciocalteu yöntemine göre değerlendirilmiştir (Karkar, Şahin ve diğerleri, 2023; Singleton ve Rossi, 1965) TFM miktarları, standart bir gallik asit çözeltisi kullanılarak 1–60 mg/L konsantrasyon aralığında çizilen kalibrasyon grafiğinden en küçük kareler yöntemiyle belirlenen doğru denklemi üzerinden hesaplanarak gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

Analiz tüplerine 0,1 mL KÇK ekstraktı, 1,9 mL saf su, 2,5 mL hazırlanan Lowry C çözeltisi ve 0,25 mL seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Test tüpleri, 30 dk karanlık ortamda bekletilerek süre sonunda 750 nm'de UV-GB spektrofotometre cihazı ile analiz edilmiştir. Analiz sonrasında kalibrasyon

grafiğindeki doğru denklemi kullanılarak KÇK ekstraktlarının TFM miktarları mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak belirlenmiştir.

ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite analizi

KÇK ekstraktlarının antioksidan kapasite değerlerinin belirlenmesinde ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) yöntemi kullanılmıştır (Karkar ve Şahin, 2022; Re,Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang ve Rice-Evans, 1999). Antioksidan kapasite değerleri standart madde olan troloks eşdeğeri olarak verilmiştir. Troloks standardının 0,3–10,0 mg/L aralığında değişen konsantrasyonlara karşılık absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi belirlenmiştir.

Analiz tüplerine 0,1 mL KÇK ekstraktı, 3,9 mL etanol ve 1 mL 1/10 oranında hazırlanmış $ABTS^{\bullet}$ radikal çözeltisi eklenmiştir. 6 dk sonra tüm örneklerin UV-GB spektrofotometre cihazı ile absorbans ölçümleri (734 nm) gerçekleştirilmiştir ($A_{örnek}$). Ölçümler sırasında kör olarak nitelendirilen örnekler hazırlanmış (4 mL etanol ve 1 mL $ABTS^{\bullet}$ (radikal çözeltisi), 6 dk bekletilip absorbansları (734 nm) ölçülmüştür ($A_{kör}$). Analiz sonrasında örneklerin % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.1'e göre hesaplanarak kalibrasyon grafiğindeki doğru denklemi kullanılmış ve KÇK ekstraktlarının antioksidan kapasite değerleri mg troloks eşdeğeri (TE)/g örnek olarak belirlenmiştir.

$$\%\ \text{İnhibisyon} = \frac{A_{kör} - A_{örnek}}{A_{kör}} \times 100 \qquad (3.1)$$

Toplam flavonoid analizi

KÇK ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği (Formagio, Volobuff, Santiago, Cardoso, Vieira ve Pereira, 2014) yöntemine göre belirlenmiştir. Toplam flavonoid içeriği kuersetin eşdeğeri olarak verilmiştir. Standart bir kuersetin çözeltisinin 0,5–10 mg/L aralığında değişen konsantrasyonlara karşılık absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi belirlenmiştir.

Analiz tüplerine 0,5 mL örnek, %95'lik etanol (1,5 mL), %10'luk alüminyum klorür çözeltisi (0,1 mL), 1 M'lık sodyum asetat çözeltisi (0,1 mL) ve saf su (2,8 mL) eklenerek karıştırılmıştır. Kör numune için %10'luk alüminyum klorür çözeltisi saf su ile toplam hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. Analiz tüpleri karanlık bir ortamda 30 dk bekletilmiş ve tüm örneklerin absorbansları (415 nm) ölçülmüştür. Daha sonra kalibrasyon grafiği kullanılarak KÇK ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı mg kuersetin eşdeğeri (QE)/g örnek cinsinden belirlenmiştir.

Kondanse tanen analizi

KÇK ekstraktlarının kondanse tanen tayini literatürde belirtilen yönteme göre yapılmıştır (Wilhelmy, Pavez, Bordeu ve Brossard, 2021). Kondanse tanen miktarı, kateşin eşdeğeri olarak verilmiştir. Standart kateşin çözeltisi kullanılarak 50,0–100,0 mg/L aralığında değişen konsantrasyonlara karşılık absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi belirlenmiştir.

Analiz tüplerine 0,1 mL ekstrakt/standart, 6 mL bütanol:HCl (95:5; v/v) karışımı, 0,2 mL %2'lik amonyum demir(II) sülfat hekzahidrat çözeltisi ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$), 0,9 mL saf su eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler 95ºC'de 50 dk bekletilmiş ve süresinin ardından UV-GB spektrofotometre cihazı ile 550 nm'de absorbansları ölçülmüştür. KÇK ekstraktlarının kondanse tanen miktarı mg kateşin eşdeğeri (KE)/g örnek cinsinden belirlenmiştir.

3.2.4. KÇK ekstraktının β-SD ile enkapsülasyonu

KÇK ekstraktının β-siklodekstrin (β-SD) ile enkapsülasyon işlemi için optimizasyon tekniklerinden merkezi kompozit dizayn kullanılmıştır. Literatüre göre proantosiyanidin içeriğinin 100 µg/mL'den daha yüksek olması serbest oksijen türlerinin oluşumuna ve hücre ölümlerinde artışa neden olduğundan sitotoksik etki göstermektedir (Radünz, Hackbart, Bona, Pedra, Hoffmann, Stefanello ve Da Rosa Zavareze, 2020). Bu nedenle enkapsülasyon işleminde kullanılacak olan KÇK ekstraktı proantosiyanidin konsantrasyonu 50 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. KÇK ekstraktının β-SD üzerine

maksimum miktarda enkapsülasyonu için belirlenen önemli faktörler şu şekildedir: β-SD oranı (%; w/v), KÇK ekstrakt hacmi (mL), sıcaklık (°C) ve enkapsülasyon süresi (dk). Merkezi kompozit dizaynda kullanılmış olan faktörler ve faktörlerin kodlanmış seviye değerleri Çizelge 3.5'te verilmektedir. Merkezi kompozit dizaynda faktörler ve 5 seviye aralığı tespit edildikten sonra deney sayısı (N) Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$N = 2^k + 2k + 1 + x_0 \tag{3.2}$$

Çalışmada beş seviyeli dört faktörlü merkezi kompozit dizayn uygulanmıştır. Eşitlik 3.2'de ki k, faktör sayısını, x_0 tekrarlanan deney sayısını, 2^k full faktöriyel veya fraksiyonlu faktöriyel dizayndaki deney sayılarını, $2k$ star dizayn deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını temsil etmektedir. 2^k'daki seviyeler (-1) ve (+1), $2k$'dakiler (+α) ve (-α), 1'deki ise (0)'dır. Optimizasyon çalışmaları için faktör sayısına bağlı olarak hesaplanan deney sayısı 30 (2^4+2×4+6=30) olarak belirlenmiştir. α değeri dairesel dizaynda Eşitli 3.3'ye göre hesaplanarak ±2 olarak belirlenmiştir.

$$\alpha = \pm\sqrt[4]{2^k} \tag{3.3}$$

Çizelge 3.5. Merkezi kompozit dizayn için faktörler ve kodlanmış seviye değerleri

Faktör		**Kodlanmış seviye değerleri**				
		-α	**-1**	**0**	**1**	**+α**
β-SD oranı (%; w/v)	x_1	5	7,5	10	12,5	15
Sıcaklık (°C)	x_2	20	25	30	35	40
KÇK ekstrakt hacmi (mL)	x_3	2	4	6	8	10
Enkapsülasyon süresi (dk)	x_4	20	30	40	50	60

Merkezi kompozit dizaynda her bir faktörün parabolik etkileri incelenebilir. Çizelge 3.6'da verilmiş olan deneysel tasarımdaki son altı deney orta seviyede tekrarlanan deneylere aittir. Otuz deney için enkapsülasyon etkinliği hesaplanmış ve Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease inc. USA) programı ile ANOVA analizi yapılmıştır. ANOVA analizi sonrası Eşitlik 3.4'te belirtilen ikinci dereceden denkleme göre tahmini değerler ve dört faktör için optimum değerler belirlenmiştir.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^{4} b_i x_i + \sum_{i=1}^{4} b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{3} \sum_{j=i+1}^{4} b_{ij} x_i x_j \tag{3.4}$$

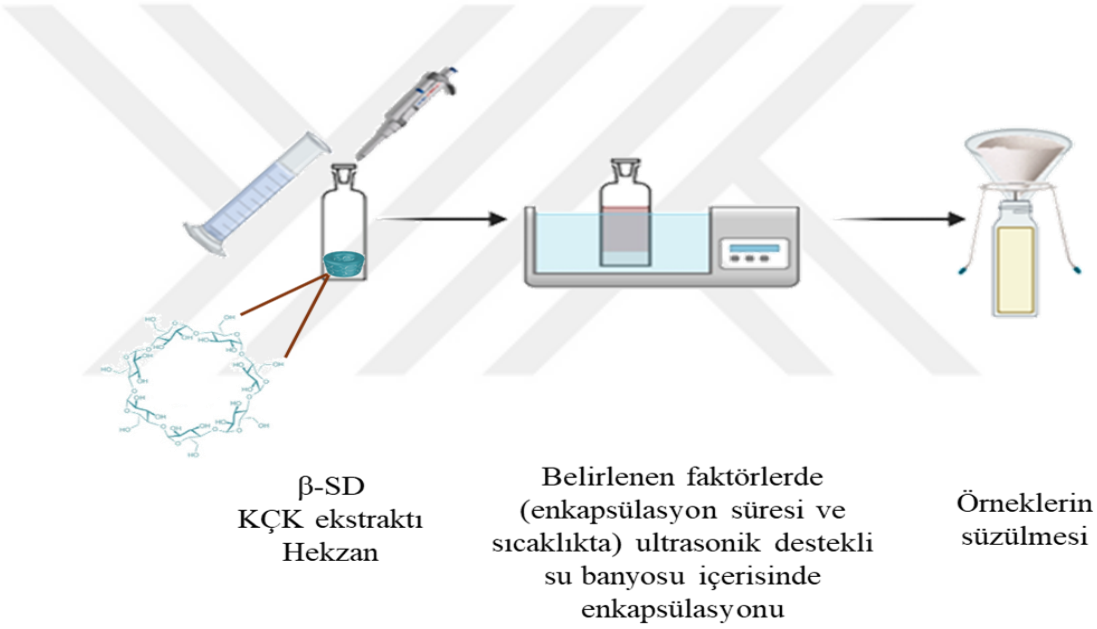
y, yanıt; b_0, sabit terim; b_i, doğrusal etkileşim sabiti; b_{ii}, parabolik etkileşim sabiti; b_{ij}, parametre etkileşim sabiti, x_i ve x_j bağımsız değişkenleri temsil etmektedir.

Çizelge 3.6. KÇK-β-SD enkapsülasyonu için deneysel tasarım

Deney Numarası	β-SD Oranı (%; w/v)	Sıcaklık (°C)	KÇK Ekstrakt hacmi (mL)	Enkapsülasyon Süresi (dk)
1	7,5	25	4	30
2	12,5	25	4	30
3	7,5	35	4	30
4	12,5	35	4	30
5	7,5	25	8	30
6	12,5	25	8	30
7	7,5	35	8	30
8	12,5	35	8	30
9	7,5	25	4	50
10	12,5	25	4	50
11	7,5	35	4	50
12	12,5	35	4	50
13	7,5	25	8	50
14	12,5	25	8	50
15	7,5	35	8	50
16	12,5	35	8	50
17	5	30	6	40
18	15	30	6	40
19	10	20	6	40
20	10	40	6	40
21	10	30	2	40
22	10	30	10	40
23	10	30	6	20
24	10	30	6	60
25	10	30	6	40
26	10	30	6	40
27	10	30	6	40
28	10	30	6	40
29	10	30	6	40
30	10	30	6	40

3.2.5. KÇK-β-SD enkapsülatının hazırlanması

KÇK-β-SD enkapsülatları literatürde yapılan çalışmalar modifiye edilerek hazırlanmıştır (Şekil 3.2) (Escobar-Avello, Avendaño-Godoy, Santos, Lozano-Castellón, Mardones, von Baer, Luengo, Lamuela-Raventós, Vallverdú-Queralt ve Gómez-Gaete, 2021; Li ve diğerleri, 2022). Çizelge 3.6'da belirtilmiş olan 30 deney; %5–%15 (w/v) aralığında β-SD oranı, 2–10 mL aralığında KÇK ekstrakt hacmi (x mL ekstrakt + (25-x) mL hekzan), 20–40ºC aralığında sıcaklık uygulamasıyla 20–60 dk aralığında enkapsülasyon süresinde ultrasonik destekli su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon süresinden sonra örnekler süzülerek çözücüler buharlaştırılmış ve kalıntı 2 mL metanol ile çözülmüştür.



Şekil 3.2. KÇK-β-SD enkapsülatının hazırlanması

3.2.6. KÇK-β-SD enkapsülatının enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.2.6'da belirtilen şekilde hazırlanan örnekler (metanol ekstraktları) 6000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süzüntüde kalan fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile spektroskopik olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3). Eşitlik 3.5'te belirtilen denkleme göre enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır:

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{x_1 - x_2}{x_1} \times 100 \qquad (3.5)$$

x_1; teorik olarak optimum hacimde bulunan mg GAE

x_2; deneysel olarak optimum hacimde bulunan mg GAE



Şekil 3.3. KÇK-β-SD enkapsülatının enkapsülasyon etkinliğinin spektroskopik olarak belirlenmesi

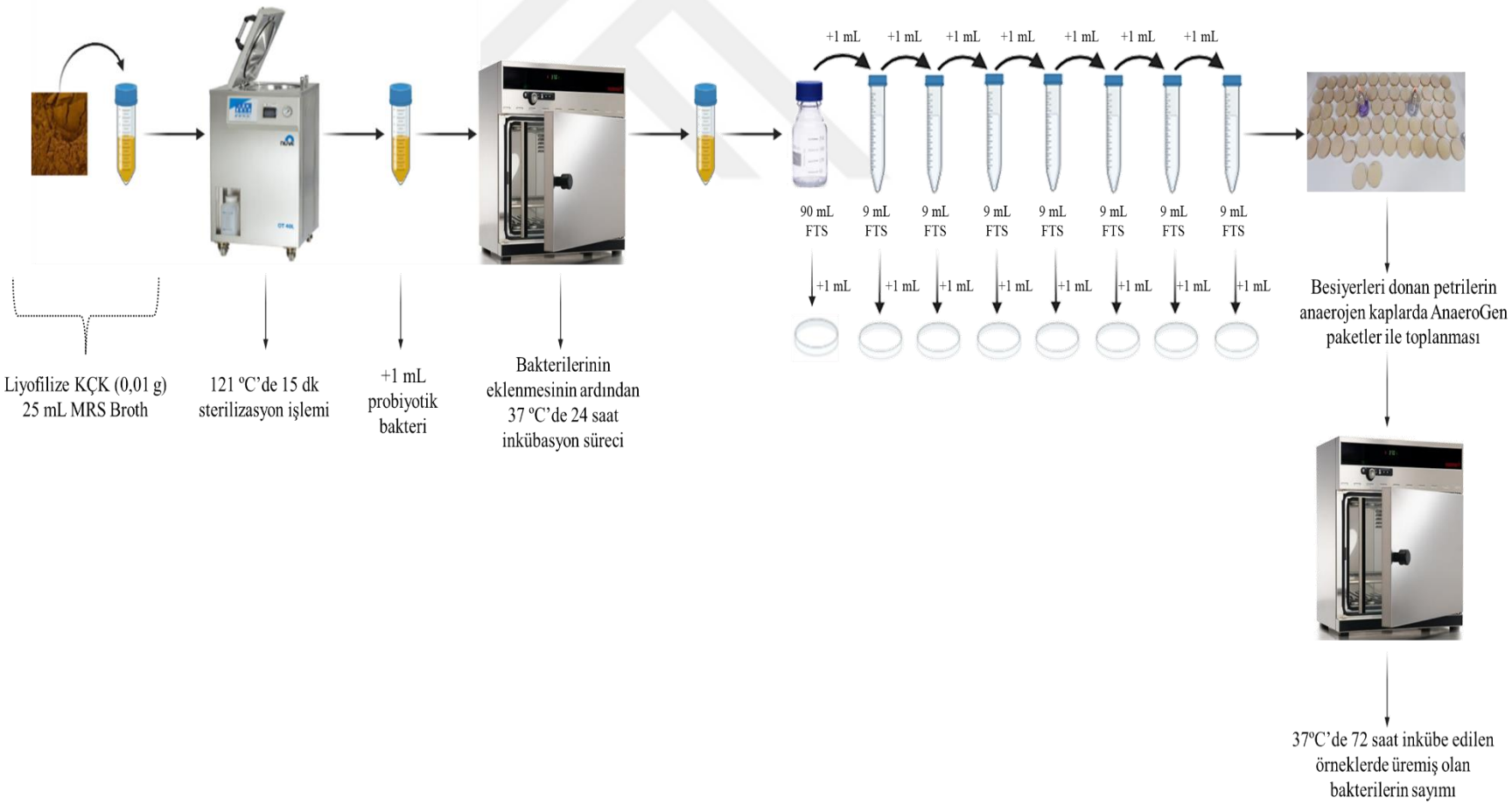
3.2.7. β-siklodekstrin-metakrilat (β-SD-MA) sentezi

Bölüm 3.2.5'te belirtilen şekilde yapılan enkapsülasyon sonucunda optimum koşullar belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen β-SD-MA elde edilmesi literatürde yapılan çalışmalar modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Kettel, Schaefer, Pich ve Moeller, 2016; Song, Mensah, Wen, Zhu, Zhang, Tan, Chen ve Li, 2021). Çalışma doğrultusunda 1,95 g β-SD 30 mL susuz *N*,*N*-dimetilformamid (DMF) içerisinde çözdürülmüş ve ardından ortama 1,7 mL susuz trietilamin eklenmiştir. Reaksiyon buz

banyosu içerisinde başlatılarak reaksiyon sıcaklığının 0°C'ye kadar soğutulması sağlanmıştır. Çözünme homojen bir şekilde gerçekleştikten sonra 0,75 mL susuz DMF içerisinde 2 mL metakriloil klorür karıştırılarak buz banyosu ortamında reaksiyon ortamına damla damla ilave edilmiştir. Karışımın oda sıcaklığına gelmesi sağlanarak 20 sa karıştırma süresi sonunda elde edilen trietilamin hidroklorür 150 mL aseton içerisine süzülerek çöktürülmüştür. Çöktürme işleminin ardından örnek 6000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek elde edilen çökelti 5 mL DMF içerisinde tekrar çözdürülmüş ve ardından 25 mL aseton içerisinde yeniden çöktürülerek ve santrifüjlenmiştir. Elde edilen katı ürün 1-propanol:su:amonyak:toluen (6:3:1:1) çözücü karışımı kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonrasında β-SD-MA elde etmek için mavi bant filtre kağıdı (12,5 cm) kullanılarak çözücü ortamdan uzaklaştırılmıştır.

3.2.8. Kızılçam kabuğunun mikrobiyolojik analizleri

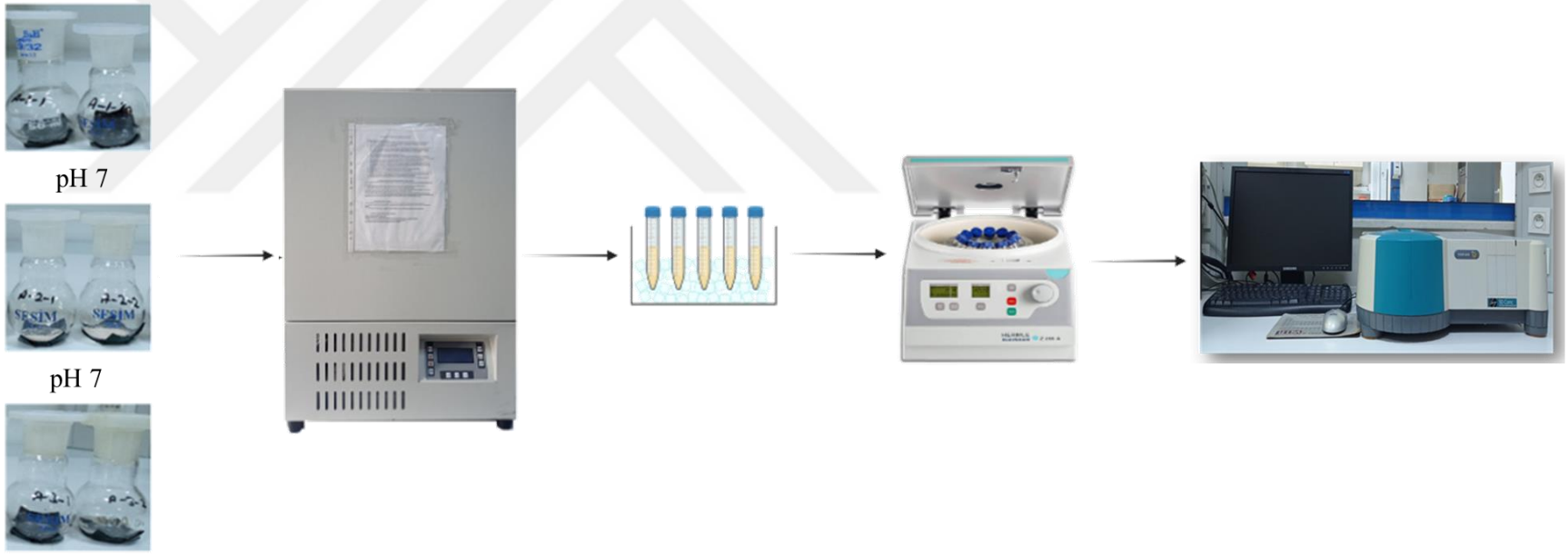
KÇK'nın *Lactobacilus acidophilus* ve *Lactobacilus casei* probiyotik bakterilerinin gelişimi üzerine etkisini incelemek için mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). %100 etanol içerikli ekstrakt belirli oranda saf su ile seyreltilmiş ve -24°C'de dondurularak -86°C'de liyofilize (0,1 mbar) edilmiştir. 0,01 g liyofilize örnek 25 mL MRS-Broth besiyeri içerisine eklenerek 121ºC'de 15 dk otoklav ile sterilize edilmiştir. KÇK'nın *L. acidophilus* ve *L. casei* probiyotik bakterilerinin gelişimine etkisi olup olmadığını tespit edebilmek için 25 mL MRS-Broth besiyerinde aynı koşullarda sterilize edilmiştir. Sterilize edilen besiyerlerinin içerisine 1'er mL *L. acidophilus* ve *L. casei* bakterilerinden ilave edilerek 37ºC'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. KÇK ekstraktının *L. acidophilus* ve *L. casei* probiyotik bakterilerinin gelişimi üzerine etkisini inceleyebilmek için besiyeri ortamında aktive edilen probiyotik bakterilerin dökme plaka yöntemi ile mikrobiyolojik ekimleri gerçekleştirilmiştir (Karkar, 2024). Şekil 3.3'te şematize edildiği şekilde gerçekleştirilen mikrobiyolojik ekim sonrası petriler 72 sa boyunca 37ºC'de inkübasyona bırakılarak bakterilerin gelişimi incelenmiştir. İnkübasyon sonrası *L. acidophilus* ve *L. casei* probiyotik bakterilerin canlı koloni sayısı log kob/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak KÇK'nın probiyotik bakterilerin canlılığı üzerine etkisi tespit edilmiştir.



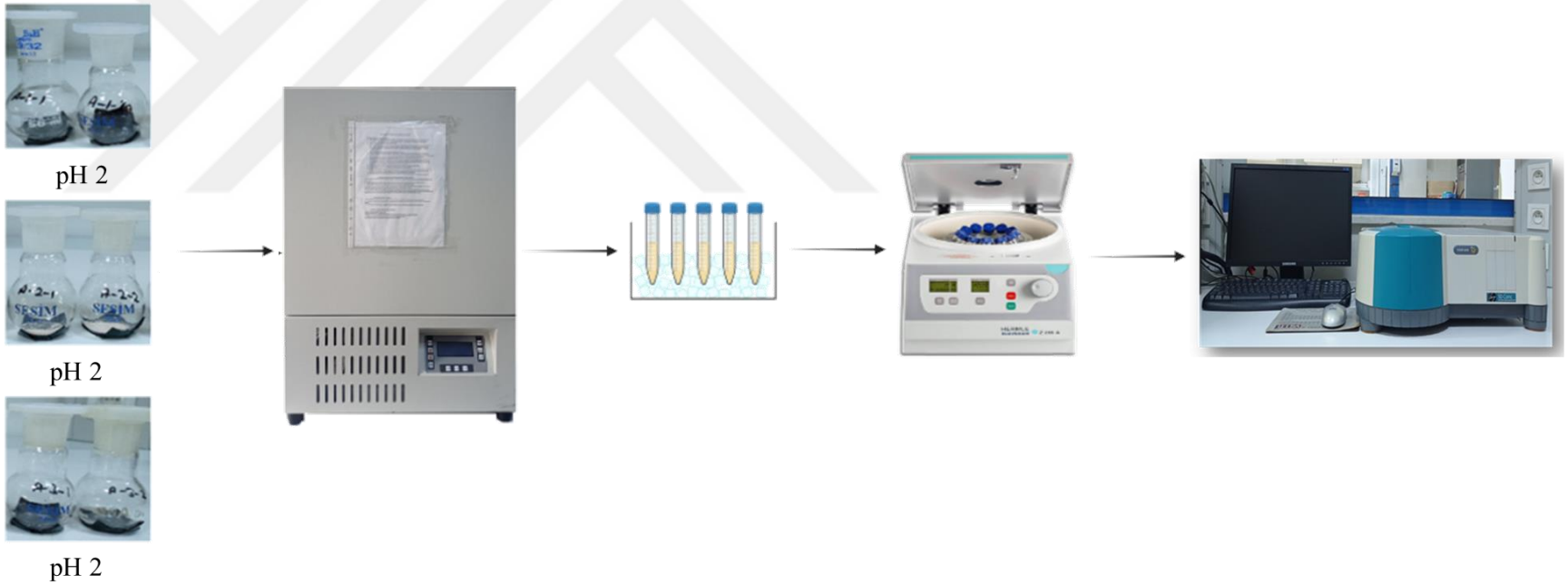
Şekil 3.4. Serbest probiyotik bakterilerinin liyofilize KÇK ekstraktı ile mikrobiyolojik analiz şeması

3.2.9. KÇK-β-SD ve KÇK'nın *in-vitro* gastrointestinal salım çalışması

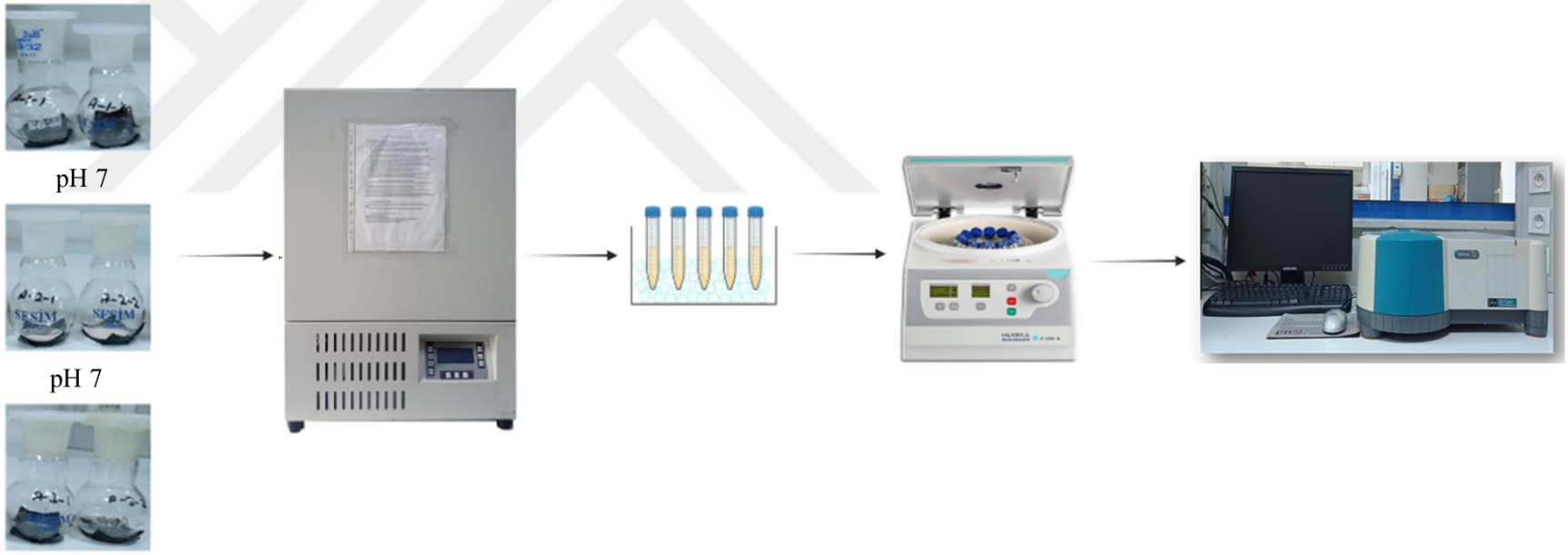
KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının simüle ağız, mide ve bağırsak ortamlarındaki salım miktarlarının belirlenmesi literatürdeki yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Karkar, 2024; Scrob, Hosu ve Cimpoiu, 2019). Simüle ağız ortamındaki (SSF) KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının fenolik bileşen salım miktarlarının incelenmesi Şekil 3.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Simüle mide ortamındaki (SGF) KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının fenolik bileşen salım miktarlarının incelenmesi (120 dk) Şekil 3.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Simüle bağırsak ortamındaki (SIF) KÇK–β–SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının fenolik bileşen salım miktarlarının incelenmesi (120 dk) Şekil 3.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. KÇK-β-SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının SSF ortamındaki salınım miktarlarının belirlenmesi



Şekil 3.6. KÇK-β-SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının SGF ortamındaki salınım miktarlarının belirlenmesi



Şekil 3.7. KÇK-β-SD enkapsülatı ve KÇK ekstraktının SIF ortamındaki salınım miktarlarının belirlenmesi

3.2.10. KÇK-β-SD enkapsülatının ve β-SD-MA monomerinin karakterizasyonu

β-SD, etanol ile hazırlanan liyofilize edilmiş KÇK ekstraktı, KÇK–β–SD ve β–SD–MA örneklerinin SEM analizleri Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Mikroskobi Laboratuvarı'nda hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. β-SD, etanol ile hazırlanan liyofilize edilmiş KÇK ekstraktı, KÇK–β–SD ve β–SD–MA örneklerinin FT–IR analizleri (PerkinElmer, Spectrum 100, ABD) Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. β-SD-MA formülasyonları ve β–SD örneklerinin NMR analizleri (Agilent 400/54, 400 MHz) Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kromatografik Bulgular

Standart fenolik maddelerin (100 mg/L) 5 noktalı olmak üzere (2–10 mg/L) ara stok çözeltileri hazırlanarak HPLC-DAD ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda konsantrasyon-pik alanları kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Çizelge 4.1'de belirtildiği şekilde en küçük kareler yöntemi yardımıyla her bir standart maddenin doğru denklemi ve validasyon parametreleri tespit edilmiştir. Kızılçam kabuğu (KÇK) ekstraktlarının HPLC-DAD ile kromatografik analizleri gerçekleştirilmiş olup fenolik madde profilleri tespit edilmiştir. Örneklerin belirlenen pik alanları standart fenolik maddelerin doğru denklemlerinde yerine konularak fenolik madde profilleri mg/g örnek olarak belirlenmiştir. KÇK ekstraktlarında tespit edilmiş olan fenolik maddelerin maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları 260, 280 ve 360 nm olarak belirlenmiştir. Analiz verileri MİNİTAB 17.0 (Minitab Inc., Stage College, PA) istatistik programı kullanılarak ANOVA (çözücü ekstraktlarının her bir fenolik bileşik için ayrı ayrı olarak, $p<0,01$) ile istatistiki olarak analiz edilmiştir.

KÇK'nın çözücü ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler ile olan ekstraktlarının fenolik madde profilleri Çizelge 4.2'de, etanol ekstraktının 280 nm'de alınan kromatogramı Şekil 4.1'de, etanol-su ekstraktının 280 nm'de alınan kromatogramı Şekil 4.2'de, metanol ekstraktının 280 nm'de alınan kromatogramı Şekil 4.3'te, metanol-su ekstraktının 280 nm'de alınan kromatogramı ise Şekil 4.4'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman KÇK ekstraktlarında protokatekuik asit, epigallokateşin, kateşin, epikateşin, epikateşin gallat, proantosiyanidin A2, hesperidin ve kuersetin fenolik bileşikleri tespit edilmiştir. Miktarsal açıdan bakıldığı zaman en yüksek miktarda hesperidinin %70 metanol içeren ekstraktta bulunduğu tespit edilmiştir. Protokatekuik asit'in 4 ekstraktta da birbirine yakın miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Epigallokateşin, epikateşin ve hesperidin %70 metanol içeren ekstraktlarda diğer ekstraktlara göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Epigallokateşin gallat %100 metanol ve %70 metanol içeren ekstraktlarda tespit edilirken, %100 etanol ve %70 etanol içeren ekstraktlarda tespit edilememiştir. Proantosiyanidin A2 %70 etanol içeren ekstraktta bol miktarda bulunurken %100 etanol içeren ekstrakta en düşük miktarda bulunmuştur. Genel olarak sonuçlara

bakıldığında fenolik bileşenlerin en yüksek miktarda %100 metanol ve %70 metanol ekstraktlarında bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. Standart fenolik maddelerin kalibrasyon verileri

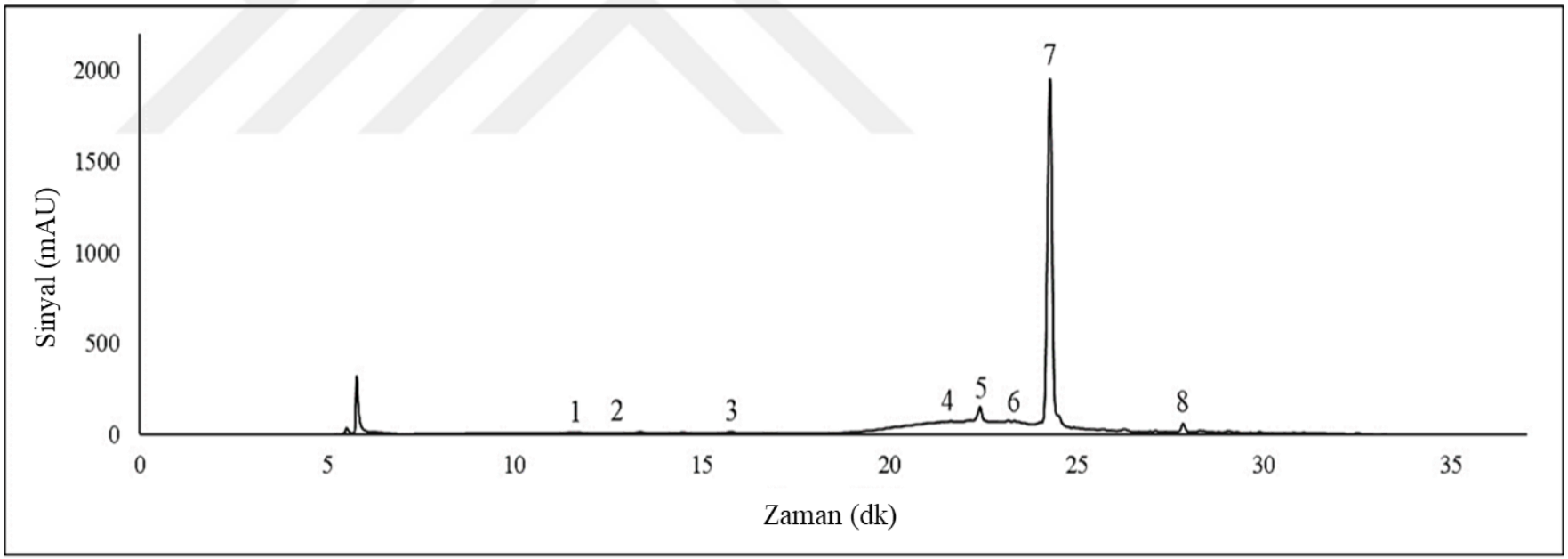
Fenolik Madde	Alıkonma Zamanı (dk)	Dalga Boyu (nm)	Kalibrasyon Denklemi	Regresyon Katsayısı (R^2)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
PCA	11,639	260	y = 95,46x + 11,58	0,9963	0,02	0,05
EPGC	12,552	280	y = 3,055x + 3,49	0,9989	0,26	0,86
CA	15,879	280	y = 24,84x - 45,48	0,9915	0,05	0,17
EPC	20,319	280	y = 8,09x - 0,56	0,9928	0,24	0,79
EPGCG	20,425	280	y = 15,565x - 13,41	0,9965	0,06	0,19
EPCG	23,325	280	y = 29,795x - 10,49	0,9928	0,07	0,25
PCA2	23,523	280	y = 11,16x + 5,2	0,9927	0,05	0,17
QCT	27,865	360	y = 61,115x - 40,87	0,9991	0,02	0,07

PCA: protokatekuik asit, EPGC: epigallokateşin gallat, CA: kateşin, EPC: epikateşin, EPGCG: epigallokateşin gallat, EPCG: epigallokateşin gallat, PCA2: proantosiyanidin A2, QCT: kuersetin

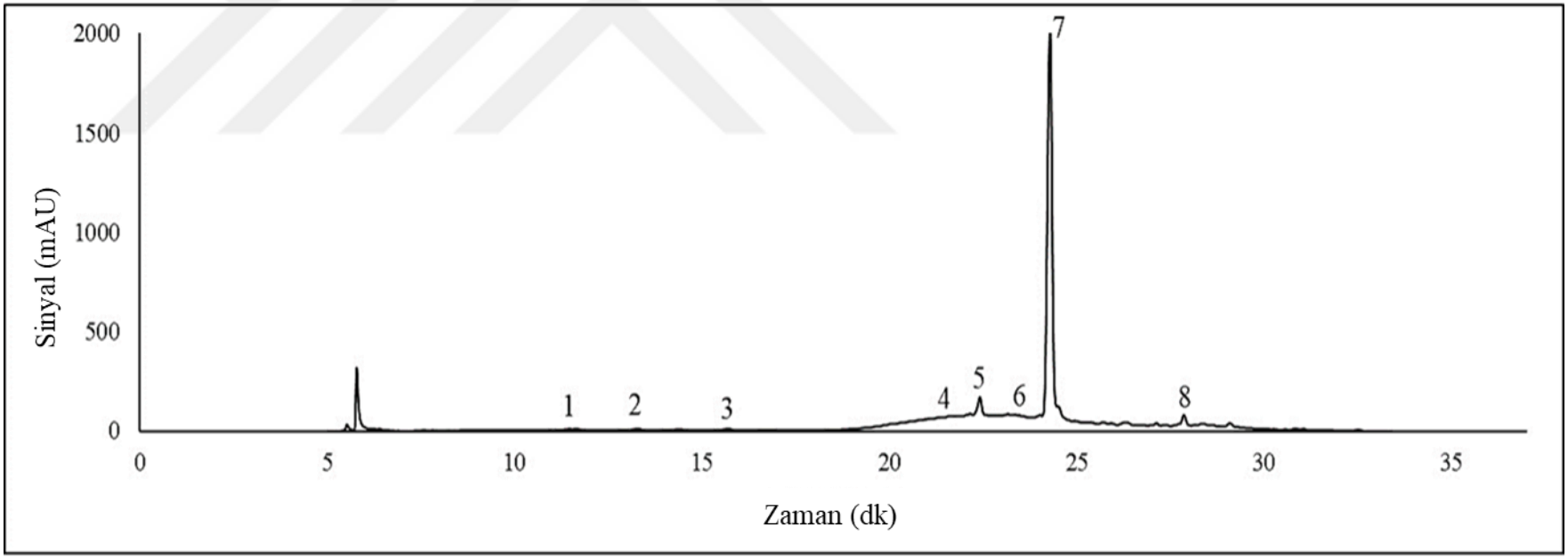
Çizelge 4.2. KÇK çözücü ekstraksiyonu fenolik madde içeriği (mg/g örnek)

Çözücü	PA	EPGC	CA	EPC	EPGCG	EPCG	PCA2	HSP	QE
E	0,19±0,01^{bEF}	0,80±0,06^{cC}	0,10±0,01^{cFG}	18,18±0,10^{bA}	te	0,34±0,01^{bDE}	0,02±0,01^{cG}	9,56±0,07^{bB}	0,34±0,01^{cD}
M	0,23±0,01^{aF}	0,86±0,09^{cEF}	0,15±0,01^{bFG}	11,84±0,01^{cA}	0,05±0,01^{bG}	1,34±0,05^{aD}	0,04±0,01^{cG}	8,89±0,05^{bB}	1,69±0,01^{aC}
E-S	0,19±0,01^{bEF}	1,19±0,07^{bD}	0,09±0,01^{cF}	18,78±0,17^{bA}	te	0,42±0,03^{bE}	4,67±0,06^{aC}	9,61±0,10^{bB}	0,34±0,01^{cE}
M-S	0,20±0,01^{bEF}	4,32±0,03^{aC}	0,62±0,01^{aE}	55,95±0,40^{aA}	0,29±0,02^{aEF}	0,03±0,01^{cF}	0,59±0,03^{bEF}	39,38±0,34^{aB}	1,27±0,02^{bD}

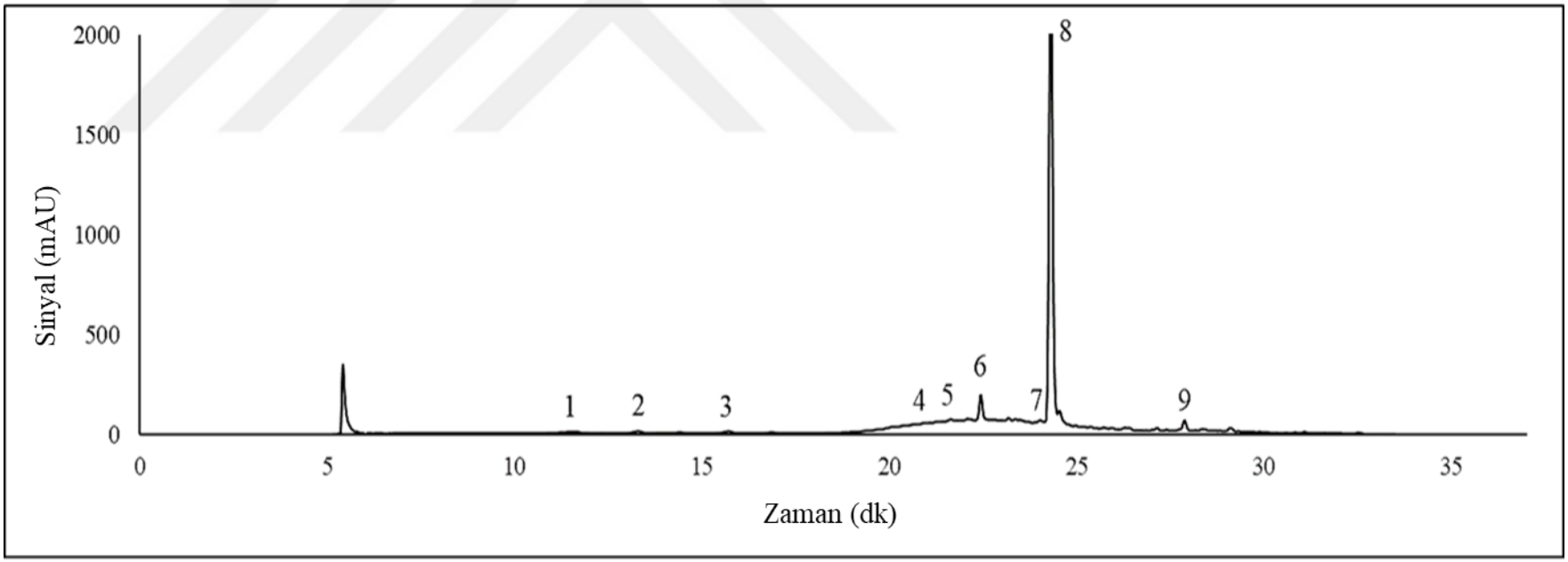
E: etanol, M: metanol, E-S: etanol-su, M-S: metanol-su, PCA: protokatekuik asit, EGC: epigallokateşin, CA: kateşin, EC: epikateşin, EGCG: epigallokateşin, ECG: epikateşin gallat, PCA2: proantosiyanidin A2, HSP: hesperidin, QCT: kuersetin, te: tespit edilemedi.
a-c: Küçük harfler bir ekstrakttaki farklı fenolik bileşikler arasında istatistiksel olarak farklı grupları gösterir (p< 0,01).
A-G: Büyük harfler bir fenolik bileşiğin farklı ekstraktları arasında istatistiksel olarak farklı grupları gösterir (p< 0,01).



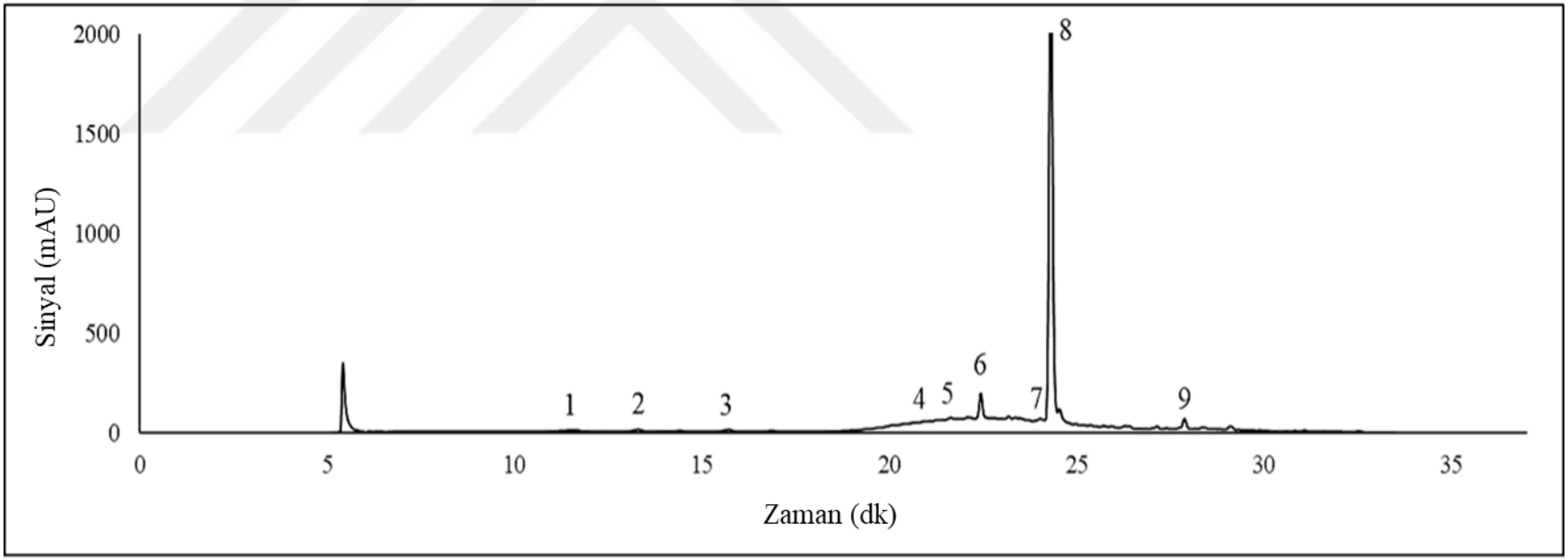
Şekil 4.1. KÇK etanol ekstraktının kromatogramı (280 nm) (1: protokatekuik asit, 2: epigallokateşin, 3: kateşin, 4: epikateşin, 5: epigallokateşin gallat, 6: epikateşin gallat, 7: proantosiyanidin A2, 8: hesperidin)



Şekil 4.2. KÇK etanol-su (%70:30) ekstraktının kromatogramı (280 nm) (1: protokatekuik asit, 2: epigallokateşin, 3: kateşin, 4: epikateşin, 5: epikateşin gallat, 6: proantosiyanidin A2, 7: hesperidin, 8: kuersetin)



Şekil 4.3. KÇK metanol ekstraktının kromatogramı (280 nm) (1: protokatekuik asit, 2: epigallokateşin, 3: kateşin, 4: epikateşin, 5: epigallokateşin gallat, 6: epikateşin gallat, 7: proantosiyanidin A2, 8: hesperidin, 9: kuersetin)



Şekil 4.4. KÇK metanol-su (%70-30) ekstraktının kromatogramı (280 nm) (1: protokatekuik asit, 2: epigallokateşin, 3: kateşin, 4: epikateşin, 5: epigallokateşin gallat, 6: epikateşin gallat, 7: proantosiyanidin A2, 8: hesperidin, 9: kuersetin)

Demirtas, Musa, Salgirli-Demirbas, Ozturk, Pekcan, Toprak, Safak, Unler, Saral ve Emre M, 2021 tarafından yapılan bir araştırmada *P. brutia* kabuk ekstraktları 1/10 oranında saf su ile 55ºC'de 6 sa süreyle ekstrakte edilmiştir. Çalışmada ekstraktlarda protokatekuik asit, kateşin, epikateşin ve kuersetin varlığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda 1,4 µg/g protokatekuik asit, 6,4 µg/g kateşin, 5,8 µg/g epikateşin ve 17,7 µg/g kuersetin bulunmuştur. Ince, Yesil-Celiktas, Karabay-Yavasoglu ve Elgin, 2009 tarafından *P. brutia* kabuk ekstraktları kullanılarak yapılan bir başka çalışmada 2,06±0,09 mg/g epikateşin ekstraktı bulunmuştur. Farklı başka bir çalışmada da 5 farklı türde (*P. nigra, P. brutia, P. halepensis, P. sylvestris* ve *P. pinea*) ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve HPLC-DAD ile fenolik bileşenler tespit edilmiştir (Şeker, Çelik, Dost ve Erdoğan, 2021). Ekstraksiyon işleminde tespit edilen epikateşin miktarları sırasıyla şu şekildedir: 0,076±0,002, 0,027±0,001, 0,046±0,001 ve 0,066±0,002 mg/g. Analizi gerçekleştirilen 5 türden sadece *P. pinea*'da kateşin tespit edilmemiştir. Aktaş, Şeker ve Karaköse, 2022 tarafından yapılan yeni bir çalışmada, üç farklı çam türünün kabukları incelenmiştir: *P. pinea, P. sylvestris* ve *P. pinaster*. Çalışmada epikateşinin sadece *P. pinea* (0,022±0,001) ve *P. Pinaster*'da (0,011±0,001 mg/g örnek) bulunduğu, protokatekuik asidin ise her üç türde de *P. pinea, P. sylvestris* ve *P. pinaster* için sırasıyla 0,041±0,001 mg/g örnek, 0,271±0,010 mg/g örnek ve 0,138±0,005 mg/g örnek konsantrasyonlarında olduğu bulunmuştur. *P. pinaster* ve *P. nigra* kabukları Ramos, Pereira, Gomes, Neto, Almeida, Santos, Silva ve Silvestre, 2022 tarafından çalışılmıştır. Çalışma sonucunda *P. pinaster* ve *P. nigra*'da protokatekuik ve kateşin tespit edilmiştir. *P. pinaster*'da protokatekuik asit 0,35±0,01 g/kg, kateşin ise 2,29±0,30 g/kg olarak bulunmuştur. *P. nigra*'da protokatekuik asit 0,39±0,06 g/kg ve kateşin 2,80±0,17 g/kg olarak bulunmuştur. Bir başka çalışmada *P. sylvestris* sürgünleri 3 farklı kurutma yöntemi (doğal, dondurarak ve vakum altında kurutma) ile kurutulmuş ve 21ºC'de 15 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Dziedziński, Kobus-Cisowska, Szymanowska-Powałowska, Stuper-Szablewska ve Baranowska, 2020). Çalışma sonucunda doğal kurutma yöntemi sonucu kuersetin miktarı 155,76±7,49 µg/g, dondurarak kurutma sonucu 187,68±10,98 µg/g ve vakum altında kurutma yöntemi sonucu ise 243,74±7,4 µg/g olarak bulunmuştur.

4.2. Spektroskopik Bulgular

KÇK örneklerinin çözücü ekstraksiyonunda etanol, etanol-su (70:30, %v/v), metanol ve metanol-su (70:30, %v/v) çözücü sistemleri kullanılarak ekstraktlar hazırlanmıştır. Ekstraksiyonda elde edilen ekstraktlara toplam fenolik madde, toplam flavonoid, antioksidan kapasite tayin yöntemlerinden ABTS ve kondanse tanen yöntemleri uygulanmıştır. Analiz sonuçlarının mg/g örnek cinsinden hesaplanması için her bir yöntemin standart eşdeğeri cinsinden kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Ekstraktların spektroskopik analiz sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen mg/g örnek sonuçları MİNİTAB 17.0 (Minitab Inc., Stage College, PA) programı kullanılarak ANOVA (çözücü ekstraktlarının her bir yöntem için ayrı ayrı, $p<0,01$) ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

KÇK örneklerinin %70 metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarında toplam fenolik madde içeriğinin (500,15±6,69 mg GAE/g örnek) ve ABTS antioksidan kapasite değerinin (25,37±0,63 mg TE/g örnek) en yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Toplam flavonoid analizlerinin sonuçlarına bakıldığı zaman en yüksek sonuç %70 etanol (4,19±0,05 mg QE/g örnek) kullanılarak elde edilen ekstraktlarda ve kondanse tanen analizlerinin sonuçlarına bakıldığı zamanda en yüksek sonuç %100 metanol (359,56±33,69 mg KE/g örnek) kullanılarak elde edilen ekstraktlarda tespit edilmiştir. Genel anlamda bakıldığı zaman KÇK'daki fenolik bileşenlerin çözücü-su içerikli çözücü sistemlerinde daha yoğun ve miktarsal anlamda daha fazla tespit edildiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3. Spektroskopik yöntemler için kalibrasyon verileri

Yöntem	Konsantrasyon aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	R^2
Toplam fenolik madde	1–60	y = 0,0314x - 0,0015	0,9978
Antioksidan kapasite	0,3–10	y = 8,8122x - 2,2937	0,9981
Toplam flavonoid	0,5–10	y = 0,1053x - 0,0061	0,9996
Kondanse tanen	50–100	y = 0,0033x - 0,0714	0,9942

Çizelge 4.4. KÇK çözücü ekstraksiyonu spektroskopik bulguları

Ekstrakt	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g örnek)	ABTS (mg TE/g örnek)	Toplam Flavonoid (mg QE/g örnek)	Kondanse Tanen (mg KE/g örnek)
E	$347,78\pm3,64^{dA}$	$199,19\pm0,08^{cB}$	$2,31\pm0,01^{dC}$	$319,42\pm24,10^{aA}$
M	$406,81\pm2,83^{cA}$	$231,66\pm3,35^{bB}$	$3,16\pm0,02^{cC}$	$359,56\pm38,69^{aA}$
E-S	$461,84\pm0,11^{bA}$	$249,08\pm6,63^{aC}$	$4,19\pm0,05^{aD}$	$338,67\pm27,79^{aB}$
M-S	$500,15\pm6,69^{aA}$	$258,37\pm0,63^{aC}$	$3,90\pm0,05^{bD}$	$346,60\pm16,42^{aB}$

E: etanol, M: metanol, E-S: etanol-su, M-S: metanol-su, GAE: gallik asit eşdeğeri, TE: troloks eşdeğeri, QE: kuersetin eşdeğeri, KE: kateşin eşdeğeri
a-d: Küçük harfler bir ekstrakttaki farklı yöntemler arasında istatistiksel olarak farklı grupları gösterir (p<0,01).
A-D: Büyük harfler bu yöntemdeki farklı ekstraktlar arasında istatistiksel olarak farklı grupları gösterir (p<0,01).

Literatürde bulunan bir çalışmada, *P. brutia, P. nigra* ve *Cedrus libani*'nin kozalakları kullanılarak 12 sa boyunca soxhlet ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Semerci ve İnceçayir, 2020). Elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *P. brutia*'nın toplam fenolik madde içeriği 91,0±0,04 mg GAE/100 g örnek, *P. nigra*'nın toplam fenolik madde içeriğinin 135,0±0,22 mg GAE/100 g örnek ve *Cedrus libani*'nin toplam fenolik madde içeriğinin 220,0±0,08 mg GAE/100 g örnek olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada (Apetrei, Tuchilus, Aprotosoaie, Oprea, Malterud ve Miron, 2011) *Pinus cembra* çam ağacının kabuk ve iğneleri kullanılarak %80 metanol ile oda sıcaklığında 1 sa boyunca ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. *P. cembra*'nın kabuk ekstraktının 299,3±1,4 mg GAE/g örnek toplam fenolik madde içerdiği ve 74,3±0,5 mg CE/g örnek proantosiyanidin madde miktarı içerdiği belirtilmiştir. *Pinus cembra*'nın iğne ekstraktının toplam madde içeriğinin 78,22±0,44 mg GAE/g örnek, proantosiyanidin madde miktarının ise 12,7±0,3 mg CE/g örnek olduğu belirtilmiştir. Guri, Kefalas ve Roussis, 2006 tarafından yapılan çalışmada *Pinus brutia*'nın taze ve kuru iğne ve kabuklarından fenolik maddeler ekstrakte edilmiştir. $CHCl_3$:MeOH (3:1) çözücü sistemi kullanılmış ve 200 mL çözücü ile 1 sa süreyle ekstrakte edilerek organik faz ve sulu faz ayrılmıştır. Organik faz su ile yıkandı ve su Na_2SO_4 ile uzaklaştırıldı ve 10 mL $CHCl_3$:MeOH (1:1) (F1) ile çözüldü. Sulu faz 2 N HCl ile nötralize edildi ve $CHCl_3$ ile tekrar ekstrakte edildi (F2). Sonuç olarak, kabuk örneklerinde 2,8±0,009 mg GAE/100 g iğne dokusu (F1) ve 1,1±0,002 mg GAE/100 g iğne dokusu (F2) tespit edilmiştir. Ulukanlı, Karabörklü, Bozok, Ateş, Erdoğan, Cenet ve Karaaslan, 2014 tarafından yapılan çalışmada *Pinus brutia* reçinesi hidrodistilasyon ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen yağ örnekleri susuz Na_2SO_4 ile kurutularak toplam fenolik içeriği belirlenmiştir (17,02 mg GAE/uçucu yağ). Chammam, Fillaudeau, Romdhane ve Bouajila, 2024 tarafından yapılan çalışmada, *Pinus brutia*'nın 2024 taç yaprağı (PB-P) ve kalbi (PB-C) metanol ile ekstrakte edilmiş ve PB-P'de 282,55±9,31 mg GAE/g kuru ağırlık, PB-C'de 144,18±9,01 mg GAE/g kuru ağırlık belirlenmiştir. Ulusu ve Darıcı, 2023 tarafından yapılan çalışmada, öğütülmüş *Pinus brutia* yaprak örnekleri oda sıcaklığında 12 saat boyunca %70 aseton ile ekstrakte edilmiş ve gerekli diğer işlemlerin ardından tanen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, 29±0,72 µg TAE/100 mg toplam tanen, 0,78±0,0 µg TAE/100 mg toplam fenolik madde ve 4,68±0,12 µg TAE/100 mg kondanse tanen tespit edilmiştir. Cretu, Karonen, Salminen, Mircea, Trifan, Charalambous,

Constantinou ve Mironvd, 2013 tarafından yapılan çalışmada, *P. brutia* kabuğu %80 metanol ile ekstrakte edilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonucu elde edilen örnekler ultra saf su, dietil eter, etil asetat ve *n*-bütanol ile fraksiyonlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı açısından fraksiyonlar arasında %80 metanol ile gerçekleştirilen ekstraktın toplam fenolik madde miktarının 412,42±7,56 mg GAE/g örnek olduğu, proantosiyanidin madde miktarı açısından incelendiğinde ise ultra saf su ile gerçekleştirilen ekstraktın proantosiyandin miktarının 250,40±1,44 mg KE/g örnek olduğu sunulmuştur. Literatürde yer alan bir başka çalışmada (Milić, Milanović, Četojević-Simin, Malenčić, Prvulović, Pavkov, Radulović, Milošević, Rašković ve Mandić, 2021) *P. nigra*'nın Mokra gora ve Tara dağlarından toplanan kabukları ekstrakte (etanol, metanol) edilmiş ve toplam fenolik madde, toplam flavonoid, proantosiyanidin miktarları ve antioksidan kapasite (ABTS) miktarı belirlenmiştir. Mokra gora'dan toplanan kabukların etanol ekstraktlarında maksimum toplam fenolik madde miktarı 26,30±0,28 mg GAE/g örnek, toplam flavonoid miktarı 0,95 ± 0,02 mg QE/g örnek, proantosiyanidin miktarı 2,55±0,11 mg CAE/g örnek ve antioksidan kapasite miktarı 18,54±0,94 mg TE/g örnek olarak tespit edilmiştir. Tara dağından toplanan kabukların ise metanol ekstraktlarında maksimum toplam fenolik madde miktarı 32,5±3,17 mg GAE/g örnek, antioksidan kapasite miktarı 17,16±1,2 mg TE/g örnek ve proantosiyanidin miktarı 2,74±0,05 mg CAE/g örnek olarak bulunmuş ancak toplam flavonoid miktarının 0,97±0,03 mg QE/g örnek olarak etanol ekstraktında daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir.

Ramos ve diğerleri, 2022 tarafından yapılan çalışmada *P. pinaster* ve *P. pinea* kabukları belirli oranlarda metanol:su: asetik asit çözücü sistemi ile 24 sa karanlıkta ekstrakte edilmiş ve antioksidan kapasite miktarı (IC_{50}) belirlenmiştir. Analiz sonucunda *P. pinaster*'de antioksidan kapasite miktarı 255,24±10,24 mg TE/g kuru örnek, *P. pinea*'da ise antioksidan kapasite miktarı 223,6±10,35 mg TE/g kuru örnek olarak tespit edilmiştir. Tálos-Nebehaj, Albert, Visi-Rajczi ve Hofmann, 2019 tarafından yapılan çalışmada 10 farklı ağacın iç-dış kabuk örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada ultrasonik destekli ekstraksiyon 20 dk oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. *P. sylvestris* (Scots pine) iç kabuğunun toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasiteleri incelendiğinde sırası ile 76,2±3,15 mg QE/g örnek; 219,0±13,98 mg TE/g örnek olarak bulunmuştur. *P.*

sylvestris dış kabuğunun toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasiteleri incelendiğinde ise sırası ile 16,4±3,32 mg QE/g örnek; 61,7±4,37 mg TE/g örnek olarak bulunmuştur.

Elde edilen çalışma sonuçları literatür ile kıyaslandığı zaman uyumluluk içerisinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ekstraksiyon süresinin ve ekstraksiyon türünün değişkenliği (soxhlet, ultrasonik destekli ekstraksiyon) ve ekstraksiyonun oda sıcaklığında gerçekleştirilmesinin tespit edilen toplam fenolik madde, antioksidan kapasite, toplam flavonoid ve kondanse tanen (proantosiyanidin) miktarlarında farklılıklar yarattığı sonucuna varılmıştır. Ekstraksiyon sonucuna etki eden faktörlerin süre, sıcaklık ve ekstraksiyon türü olması dışında ekstraksiyonda kullanılacak olan çözücünün de sonucu büyük ölçüde etkileyeceği çalışmalarca tespit edilmiştir (Atak ve Uslu, 2018). Bu nedenle her materyal için sabit, kesin kabul görmüş bir ekstraksiyon yöntemi bulunmamaktadır.

4.3. KÇK'nın β-SD ile Enkapsüle Edilmesi ve Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

KÇK'nın β-SD ile enkapsüle edilmesinde optimum koşulların belirlenmesi için Çizelge 3.10'da verilen parametrelere göre optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kapsüllerin toplam fenolik madde içerikleri hesaplanarak enkapsülasyon verimi (%) hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin Design Expert 7.0.0. (Stat-Ease inc. USA) programı kullanılarak ANOVA analizi yapılmıştır (Çizelge 4.5). ANOVA analizi sonrasında enkapsülasyon için Çizelge 4.6'da verilen ikinci dereceden polinom denklemi hesaplanmıştır. Çizelge 4.7'de enkapsülasyon sonrası bulunan deneysel değerler ve ANOVA analizinde elde edilen tahmini değerler sunulmuştur.

Çizelge 4.5. KÇK–β–SD enkapsülasyonu için ANOVA sonuçları

Kaynak	**SS**	**DF**	**MS**	***F* değeri**	***p* değeri**
Model	247,40	14	17,67	29,75	<0,0001
x_1 (β-SD oranı)	0,14	1	0,14	0,23	0,6368
x_2 (Sıcaklık)	0,14	1	0,14	0,23	0,6404
x_3 (KÇK ekstrakt hacmi)	195,17	1	195,17	328,53	<0,0001
x_4 (Enkapsülasyon süresi)	1,52	1	1,52	2,56	0,1305
x_1x_2	3,53	1	3,53	5,95	0,0276
x_1x_3	0,62	1	0,62	1,04	0,3246
x_1x_4	1,40	1	1,40	2,36	0,1450
x_2x_3	2,67	1	2,67	4,50	0,0510
x_2x_4	5,93	1	5,93	9,98	0,0065
x_3x_4	0,14	1	0,14	0,24	0,6291
x_1^2	3,17	1	3,17	5,34	0,0354
x_2^2	3,58	1	3,58	6,02	0,0269
x_3^2	7,64	1	7,64	12,86	0,0027
x_4^2	21,98	1	21,98	37,00	<0,0001
Residual	8,91	15	0,59		
Lack of fit	7,59	10	0,76	2,87	0,1281
Pure error	1,32	5	0,26		

SS: Karelerin toplamı, DF: Serbestlik derecesi, MS: Ortalamaların karesi

Çizelge 4.5'e göre, ikinci dereceden polinom modeli ANOVA'dan elde edilen *p*-değerinin 0,0001'den küçük olması, yanıt ile önemli parametreler arasındaki gerçek ilişkiyi göstermektedir. Model *F*-değerinin 29,75 olması modelin %95 güven aralığında olduğunu göstermektedir. Enkapsülasyon parametreleri β-SD, sıcaklık ve zamanın KÇK-β-SD enkapsülasyonu için ilişkili olduğunu ve R^2=0,9652 regresyon katsayısına sahip olduğunu göstermektedir.

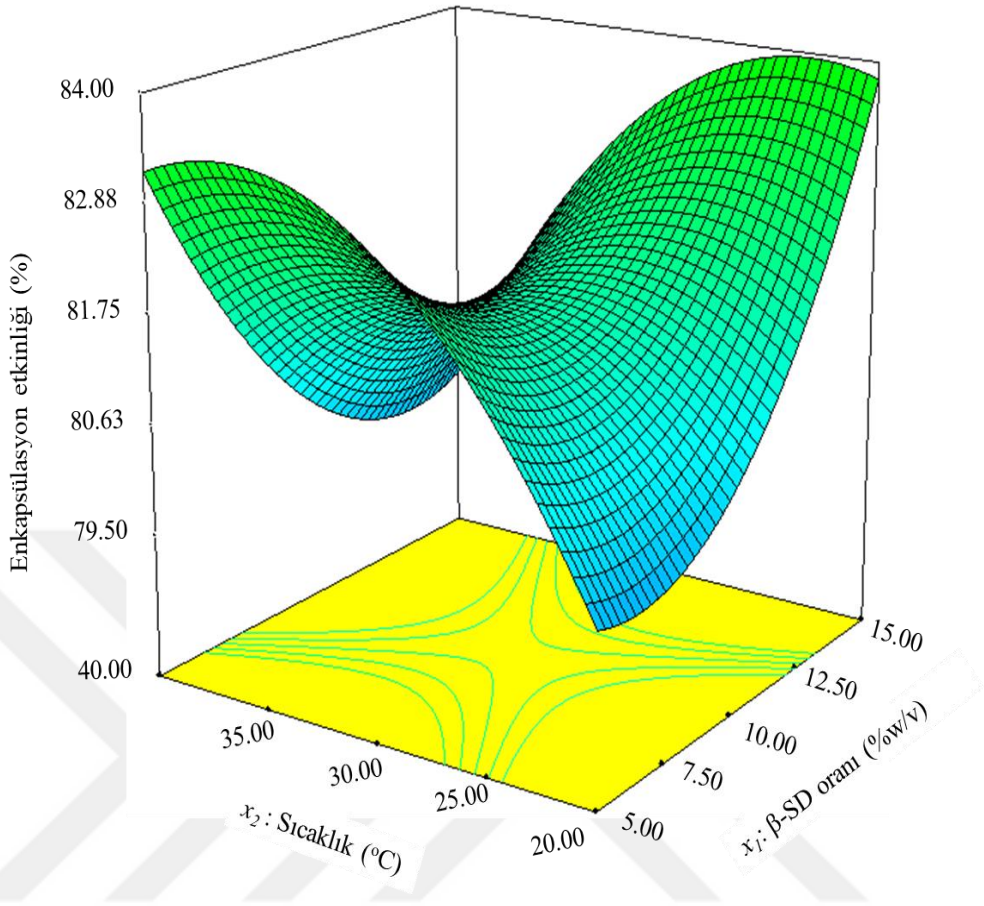
KÇK ekstraktının β–SD ile enkapsülasyonunda ANOVA analizi sonucunda tespit edilen önemli faktörlerinden olan β–SD oranı ve sıcaklık faktörlerinin ikili etkileşiminin enkapsülasyon verimine olan etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir. KÇK ekstraktının β–SD ile enkapsülasyonunda ANOVA analizi sonucunda tespit edilen önemli faktörlerinden olan sıcaklık ve zaman faktörlerinin ikili etkileşiminin enkapsülasyon verimine olan etkisini gösteren yüzey yanıt grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. KÇK-β-SD enkapsülasyonu için ikinci dereceden polinom denklemi

Yanıt	**İkinci dereceden polinom denklemi**
KÇK–β–SD	$y = 81{,}73 - 32{,}85x_1 - 0{,}075x_2 - 2{,}85x_3 - 0{,}25x_4 - 0{,}47x_1x_2 + 0{,}61 x_2x_4 + 0{,}34x_1^2 - 0{,}36x_2^2 + 0{,}53x_3^2 + 0{,}90x_4^2$

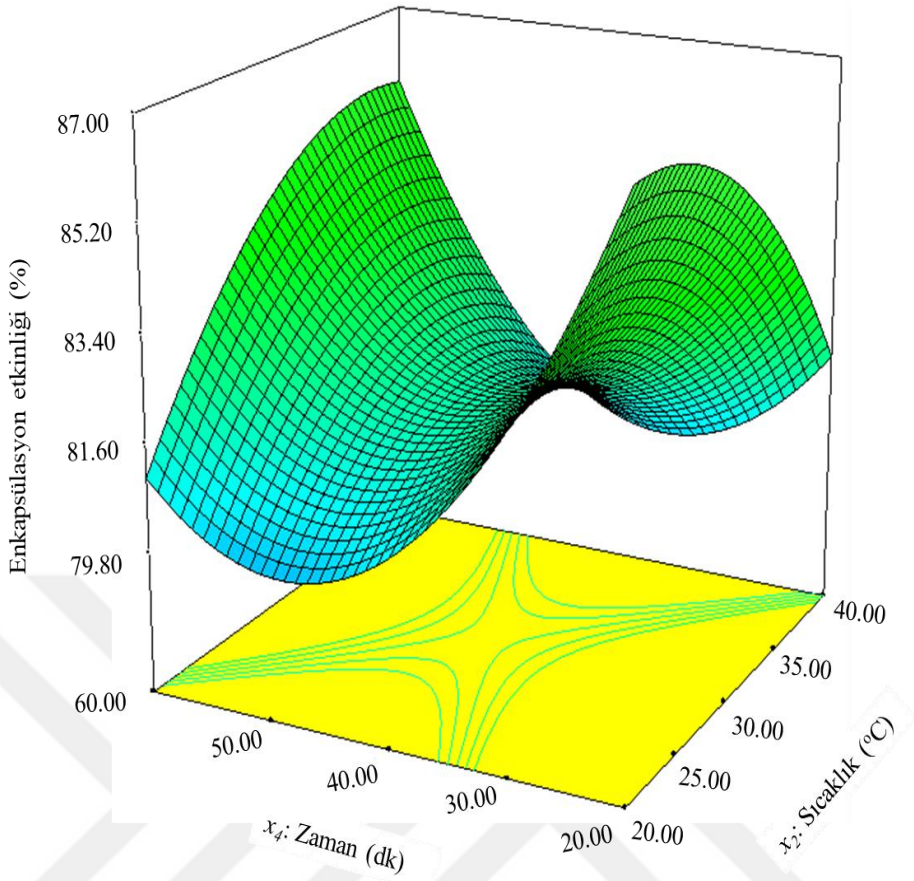
Çizelge 4.7. KÇK–β–SD enkapsülasyon etkinliğinin tahmini ve deneysel değerlere sahip merkezi kompozit dizayn tasarımı

Deney Numarası	Deneysel Değer (%)	Tahmini Değer (%)
1	84,42	85,37
2	87,64	87,45
3	86,22	85,76
4	85,22	85,96
5	81,68	81,07
6	82,78	82,36
7	78,98	79,83
8	79,65	79,24
9	84,79	84,44
10	85,43	85,33
11	86,10	87,26
12	86,43	86,27
13	79,75	79,75
14	80,17	79,86
15	81,52	80,94
16	79,38	79,17
17	83,43	82,94
18	82,72	83,24
19	79,93	80,43
20	80,61	80,13
21	90,35	89,54
22	77,30	78,13
23	86,05	85,81
24	84,54	84,80
25	81,16	81,73
26	81,17	81,73
27	81,78	81,73
28	82,00	81,73
29	81,74	81,73
30	82,51	81,73



Şekil 4.5. Kızılçam-β-siklodekstrin (KÇK-β-SD) enkapsülasyon etkinliği için üç boyutlu yanıt yüzey grafiği (β-SD oranı ve sıcaklığın enkapsülasyon etkinliğine etkisi)

Şekil 4.5'te verilen yanıt yüzey grafiğine göre, β–SD oranının ve sıcaklığın artmasının enkapsülasyon verimliliğini artırdığı görülmektedir. Buna göre, β–SD oranı sabit tutulduğunda, sıcaklık azaldıkça kapsülleme verimliliği azalmaktadır. Sıcaklık sabit tutulursa da, β–SD oranı arttıkça kapsülleme verimliliği artmaktadır. Örneğin, Çizelge 4.6 incelendiğinde, deney 1 (%7,5) ve deney 2'deki (%12,5) kapsülleme verimliliği sırasıyla %86,42 ve %87,64''ür. Benzer şekilde, deney 13 (%7,5) ve deney 14'teki (%12,5) kapsülleme verimliliği sırasıyla %79,75 ve %80,17'dir. Başka bir deyişle, diğer parametreler sabit tutulduğunda ve β–SD oranı arttığında, kapsülleme verimliliği artmaktadır.



Şekil 4.6. Kızılçam-β-siklodekstrin (KÇK-β-SD) enkapsülasyon etkinliği için üç boyutlu yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık ve zamanın enkapsülasyon etkinliğine etkisi)

Şekil 4.6'da verilen yanıt yüzey grafiğinde ise hem sıcaklığın hem de zamanın enkapsülasyon verimliliği üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Enkapsülasyon süresi sabit kaldığında, sıcaklık arttıkça enkapsülasyon veriminin azaldığı gözlenmektedir. Örneğin, Çizelge 4.6 incelendiğinde, deney 2 (30ºC) ve deney 10'daki (50ºC) enkapsülasyon verimliliği sırasıyla %87,64 ve %85,43'tür. Benzer şekilde, deney 5 (30ºC) ve deney 13'teki (50ºC) kapsülleme verimliliği sırasıyla %81,68 ve %79,75'tir. Başka bir deyişle, diğer parametreler sabit tutulup sıcaklık artırıldığında kapsülleme verimi düşmektedir.

Enkapsülasyon etkinliklerinin belirlenmesi sonucu optimum koşulların analizi sonrası gerçekleştirilen hesaplamalar doğrultusunda elde edilen tahmini-deneysel değerler ve enkapsülasyon için gerekli optimum koşullar Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.8. Deneysel-tahmini değerler ve optimum koşullar

Yanıt	Maksimum değerler		Optimum KÇK-β-SD enkapsülasyon koşulları			
	Tahmini	Deneysel	β-SD Oranı (% w/v)	Sıcaklık (ºC)	KÇK Ekstrakt Hacmi (mL)	Enkapsülasyon Süresi (dk)
Enkapsülasyon Etkinliği (%)	93,31	90,45±1,34	9,76	33,57	2,11	52,33

KÇK–β–SD: kızılçam kabuğu–β–siklodekstrin, β–SD: β–siklodekstrin

4.4. KÇK Ekstraktının Mikrobiyolojik Aktivitesinin İncelenmesi

Dişlerde çürüğe neden olan laktik asit bakterilerinin üremesini geciktirici ya da engelleyici yönde kullanılması için KÇK-β-SD enkapsülatları geliştirilmiştir. Enkapsüle edilen KÇK ekstraktının diş dolgu materyali içerisinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için KÇK ekstraktının *L. acidophilus* ve *L. casei* bakterilerinin gelişimi üzerine çalışma yapılmıştır. Bu hipotezin sonuçlanması için liyofilizasyon yöntemi ile elde edilen ekstrakt, aktive edilen bakteri ortamlarına eklenmiştir. Dökme plaka yöntemi ile ekimi gerçekleştirilen örnekler 72 sa boyunca 37ºC'de inkübe edilmiştir. Serbest haldeki *L. casei* ve *L. acidophilus* bakterilerinin mikrobiyolojik analizleri sonucunda canlı bakteri sayısı sırasıyla 8,65±0,23 log kob/mL ve 8,82±0,18 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Ekstrakt kalıntılarının probiyotik bakterilerin gelişimi üzerine etkileri incelendiği zaman ise *L. casei* ve *L. acidophilus* bakterilerinin mikrobiyolojik analizleri sonucunda canlı bakteri sayısı sırasıyla 7,31±0,28 log kob/mL ve 7,37±0,11 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda KÇK ekstraktının laktik asit bakterilerinin gelişimini 10^8'den 10^7'ye düşürdüğü görülmüştür. Buna göre KÇK ekstraktı ağızda diş çürümeleri kaynağı olan laktik asit bakterilerinin canlılığını anlamlı ölçüde önlemiştir.

4.5. KÇK ekstraktı ve KÇK- β-SD Enkapsülatının *in*-vitro Gastrointestinal Ortamdaki Salınımının Belirlenmesi

KÇK ekstraktı ve KÇK–β–SD enkapsülatının gastrointestinal ortamdaki salımının belirlenmesi amacıyla simüle ağız, mide ve bağırsak ortamlarında salım çalışması yapılmıştır. Gastrointestinal ortamdaki salım çalışmaları ardışık olarak gerçekleştirilmiş ve simüle ağız sıvısı kontrol ortam kullanılmıştır. Şekil 4.7'de KÇK ekstraktı ve KÇK–β–SD enkapsülatının *in-vitro* gastrointestinal ortamdaki salım sonuçları toplam fenolik madde (mg GAE/g örnek) cinsinden verilmiştir. Şekil 4.8'de ise KÇK ekstraktı ve KÇK–β–SD enkapsülatının *in-vitro* gastrointestinal ortamdaki salım sonuçları antioksidan kapasite (mg TE/g örnek) cinsinden verilmiştir.

Ardışık SSF, SGF ve SIF ortamlarındaki salım miktarları toplam fenolik madde miktarı açısından incelendiğinde, ağız ortamında (5 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktının fenolik bileşik salımı sırasıyla 84,48±4,74 mg GAE/g örnek ve 84,47±2,12 mg GAE/g örnek'tir. Mide ortamında (120 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktının fenolik bileşik salımı sırasıyla 94,34± 2,21 mg GAE/g örnek ve 112,72±8,10 mg GAE/g örnek'tir. Bağırsak ortamında ise (120 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktının fenolik bileşik salımı sırasıyla 75,57±1,32 mg GAE/g örnek ve 102,1±5,29 mg GAE/g örnek'tir.

Ardışık SSF ve SGF ortamlarındaki salım miktarları toplam fenolik madde miktarı olarak incelenirse, ağız ortamında (5 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktının fenolik bileşik salımı sırasıyla 84,71±0,56 mg GAE/g örnek ve 85,17±0,80 mg GAE/g örnek'tir. Mide ortamında (120 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktının fenolik bileşik salımı sırasıyla 88,95±5,82 mg GAE/g örnek ve 101,09±5,25 mg GAE/g örnek'tir.

Elde edilen sonuçlara göre salım miktarının ortamın pH değerinden etkilendiği gözlenmiştir. Ardışık SSF, SGF ve SIF ortamında ortamın pH'si arttıkça salınan ekstrakt miktarı artmaktadır. SSF ve SIF ortamlarında ise ortamın pH'si azaldıkça salınan ekstrakt miktarı azalmaktadır. Aynı zamanda ardışık SSF, SGF ve SIF ortamlarında olduğu gibi

sadece SSF ve SGF ortamları karşılaştırıldığında yine yüksek pH'si sahip ortamda salınan ekstrakt miktarının arttığı gözlenmiştir.

Ardışık SSF, SGF ve SIF ortamlarındaki fenolik bileşik salımı miktarları antioksidan kapasitesi olarak incelenirse, ağız ortamında (5 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktındaki fenolik bileşiklerin salımı sırasıyla 62,10±6,76 mg TE/g örnek ve 76,22±0,49 mg TE/g örnek'tir. Mide ortamında (120 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktındaki fenolik bileşiklerin salımı sırasıyla 12,50±0,14 mg TE/g örnek ve 12,85±0,41 mg TE/g örnek'tir. Bağırsak ortamında ise (120 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktındaki fenolik bileşiklerin salımı sırasıyla 38,59±0,22 mg TE/g örnek ve 47,90±0,65 mg TE/g örnek'tir.

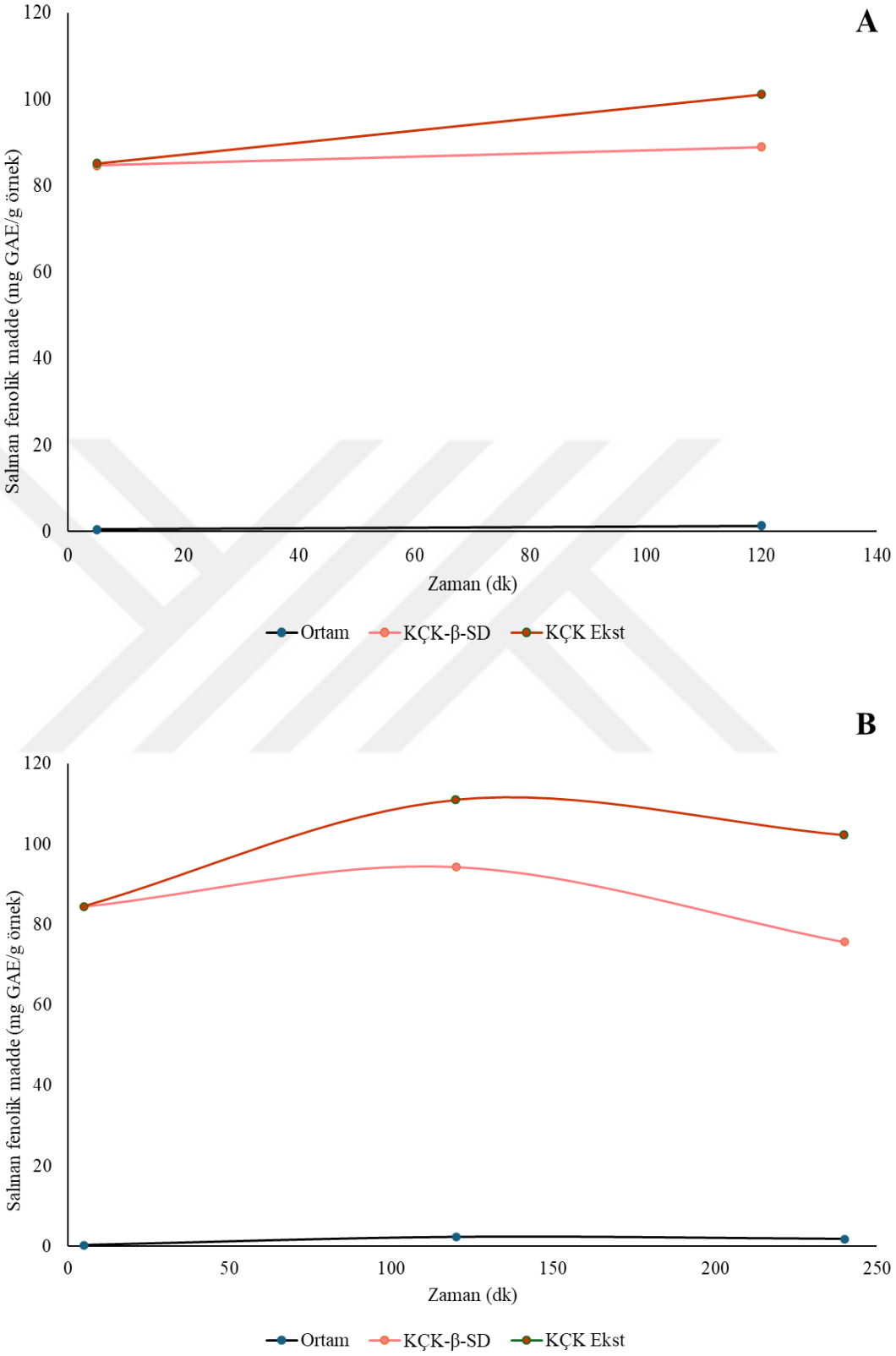
Ardışık SSF ve SGF ortamlarındaki salım miktarları antioksidan kapasitesi olarak incelenirse, ağız ortamında (5 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktındaki fenolik bileşiklerin salımı sırasıyla 69,61±3,87 mg TE/g örnek ve 78,46±0,35 mg TE/g örnek'tir. Mide ortamında (120 dk) KÇK–β–SD enkapsülatının ve KÇK ekstraktındaki fenolik bileşiklerin salımı sırasıyla 16,41±0,72 mg TE/g örnek ve 20,35±1,45 mg TE/g örnek'tir.

Ardışık SSF, SGF ve SIF ortamlarındaki salım miktarları mg TE/g örnek cinsinden incelendiği zaman ise ağız ve bağırsak pH 7 ortamlarında salınan ekstrakt miktarının arttığı gözlenmiştir. Aksi hal olan mide gibi pH 2 ortamlarda ise salınan ekstrakt miktarında azalma olduğu gözlenmiştir.

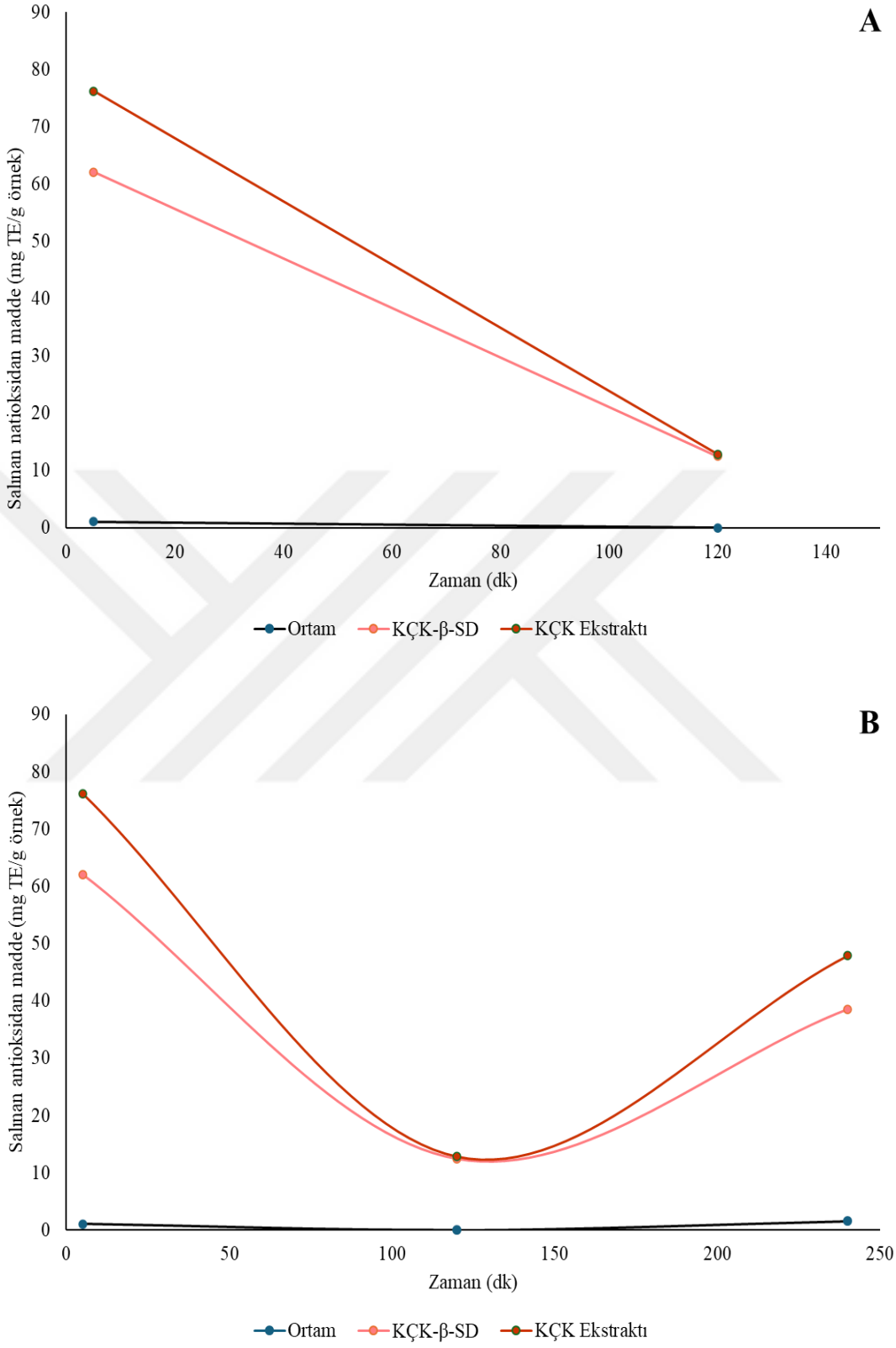
Analiz sonuçlarına göre KÇK ekstraktının her üç ortamda da salım miktarları (mg GAE/g örnek ve mg TE/g örnek cinsinden) KÇK–β–SD enkapsülatından fazla olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak karbohidratlarla enkapsüle edilen fenolik bileşiklerin, mide sindirimi sırasında pepsin etkisiyle ve asidik ortamlarda salınacağı ve biyoaktif bileşenlerin biyolojik olarak daha erişilebilir olduğu öngörülmektedir (Ozkan, Sakarya, Tas, Yurt, Ercisli ve Capanoglu, 2023). Ayrıca biyoaktif bileşenlerin sindirim sırasında miktarsal olarak azalması polimerizasyon ve epimerizasyondan kaynaklandığı belirtilmiştir (Ozkan, Kostka, Dräger, Capanoglu ve Esatbeyoglu, 2022). Biyoaktif

bileşenlerin antioksidan kapasiteleri ortamın pH değerine bağlıdır, dolayısıyla sindirim sırasında antioksidan serbest radikalleri nötralize etme düzeyleri farklı olabilir. Biyoaktif bileşenler ȮH gruplarının iyonizasyonu ile gastrointestinal ortamlardaki geçişlerde yapısal olarak değişikliklere uğrayarak yüksek pH ortamlarında antioksidan kapasitesinin artışına neden olmaktadır (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini ve Conte, 2010).

Sonuç olarak elde edilen inklüzyon kompleksinin gastroinestinal ortamlarda KÇK ekstraktında bulunan fenolik bileşenlerin stablitesini koruduğu, çözünürlüklerini değiştirdiği ve ısı/ışığa karşı duyarlılığını azalttığı gözlenmiştir.



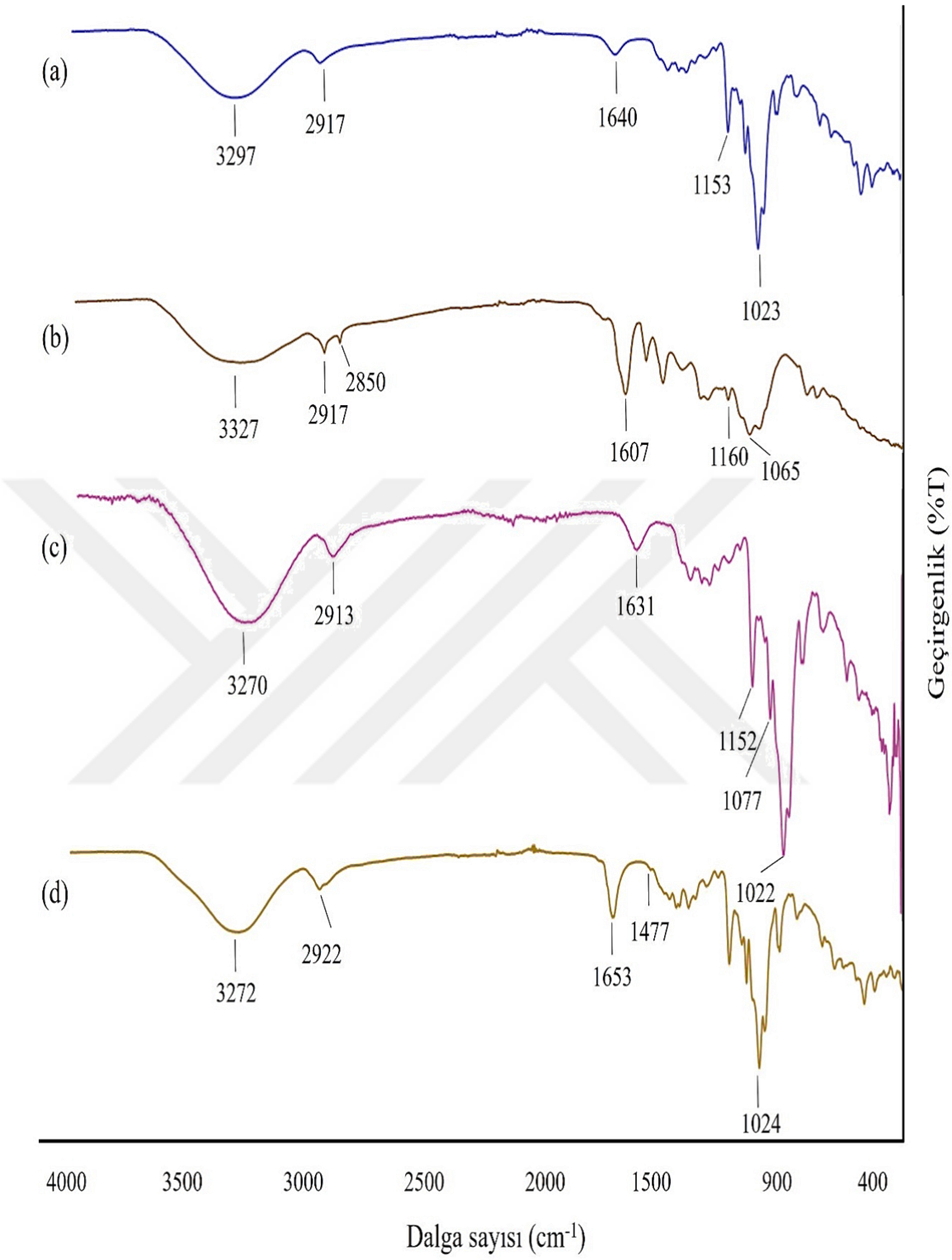
Şekil 4.7. Toplam fenolik madde cinsinden ardışık *in-vitro* gastorintestinal salınım grafiği (A: SSF (5 dk), SGF (120 dk), B: SSF (5 dk) ve SGF (120 dk) ve SIF (120 dk) ortamı)



Şekil 4.8. Antioksidan kapasite cinsinden ardışık *in-vitro* gastorintestinal salınım grafiği (A: SSF (5 dk), SGF (120 dk), B: SSF (5 dk) ve SGF (120 dk) ve SIF (120 dk) ortamı)

4.6. KÇK–β–SD Enkapsülatı ve β–SD-MA Monomerinin FT–IR Analizleri

Enkapsüle edilmemiş β–SD, liyofilize KÇK ekstraktı, KÇK ekstraktı ile enkapsüle edilmiş β–SD(KÇK-β-SD) ve metakriloil klorür ile β–SDarasında gerçekleşen reaksiyon sonucu elde edilen β-SD-MA monomerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.9'da verilmiştir. β–SD'nin FT-IR spektrumu, molekülde bulunan belirli kimyasal gruplara karşılık gelen birkaç bandı göstermektedir. 3297 cm^{-1}'deki bant O–H grubunun varlığını gösterirken, 2917 cm^{-1}'deki bant C–H gerilme titreşimi ile ilişkilidir. 1640 cm^{-1}'deki bant H–O–H bükülmesine karşılık gelir ve 1153 ve 1203 cm^{-1}'deki bantlar sırasıyla C=O germe bandını ve simetrik germe titreşimlerini temsil etmektedir (Abarca, Rodríguez, Guarda, Galotto ve Bruna, 2016; Jemli, Pinto, Kanhounnon, Ben Amara, Sellaoui, Bonilla-Petriciolet, Dhaouadi, Ameri, Silva, Bejar, Dotto ve Badawi, 2023). Metakrilat gruplarının β–SD ile reaksiyonu sonucu oluşan β–SD–MA monomeri saf β–SD ile karşılaştırılmıştır. FT–IR spektrumu incelendiğinde, karakteristik olarak ester bağının C=O gerilmesinin bir sonucu olarak 1705 cm^{-1}'de yeni bir pik (düşük yoğunluklu) gözlendi. Ayrıca, C=C bağının pik yoğunluğunun karakteristik olarak 1653 cm^{-1}'de arttığı gözlemlenmiştir (Song, Mensah, Wen, Zhu, Zhang, Tan, Chen ve Li, 2021). KÇK ile β–SD enkapsülasyonu sonrasında hidrojen bağı yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. C=C bağının pik yoğunluğu (1607, 1631 cm^{-1}) enkapsülasyon sonrası azalmıştır. Liyofilize KÇK ekstraktında bulunan 2850 cm^{-1}'de ki pik KÇK ile β–SD enkapsülasyonu sonrasında KÇK-β-SD spektrumunda gözlenmemiştir. KÇK–β–SD kapsülleri (c) ve β–SD (d) spektrumları karşılaştırıldığında iki spektrum arasında benzerlik olduğu gözlenmiş, ancak KÇK–β–SD kapsülleri (c) ile liyofilize KÇK ekstraktının spektrumları arasında çok fazla benzerlik olmadığı gözlenmiştir. Bu durumda elde edilen KÇK etanol ekstraktlarının β–SD'nin iç kısımlarına (hidrofobik boşluk) gömülmüş olduğu yani enkapsülasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Chen, Li, Ma, Mcdonald ve Wang, 2019). β–SD'nin KÇK ekstraktı ile kapsüllenmesi yapıyı bozmamış ancak pik yoğunluklarında artışa neden olmuştur. Enkapsülasyondan sonra hidrojen bağı yoğunluklarında bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, β–SD metakrilatlandıktan sonra (β–SD–MA), bu hidrojen bağının yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir.



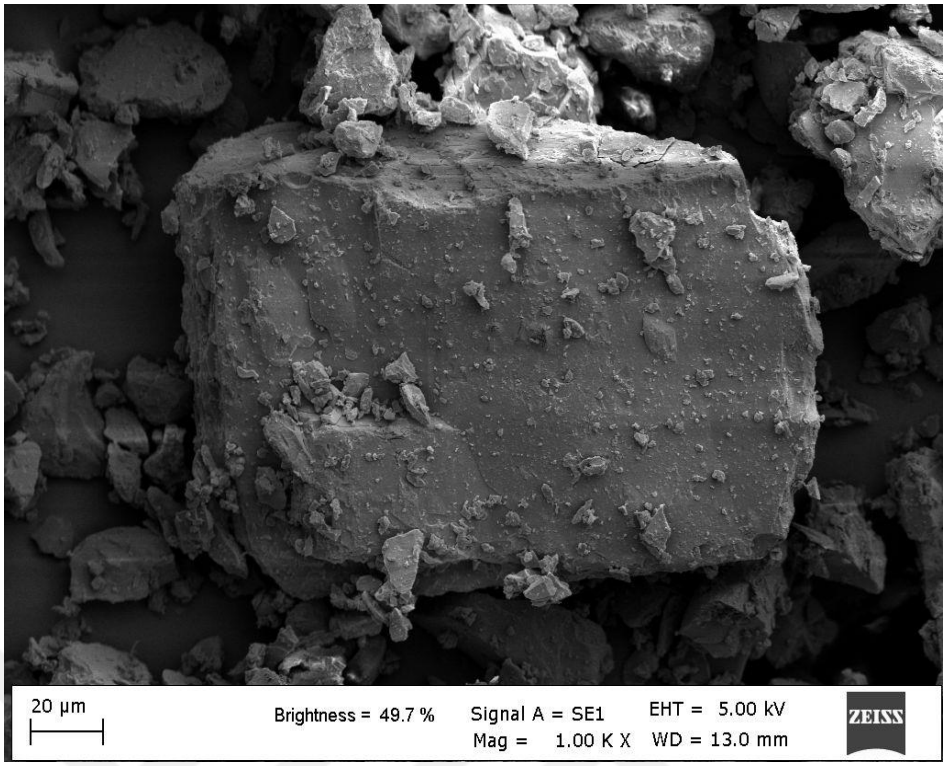
Şekil 4.9. β-siklodekstrin (β–SD) örneklerinin FT–IR spektrumları (a: β-siklodekstrin, b: liyofilize kızılçam kabuğu (KÇK) ekstraktı, c: kızılçam kabuğu–β–siklodekstrin (KÇK–β–SD), d: β-siklodekstrin–metakrilat (β–SD–MA)

4.7. β–SD, KÇK–β–SD ve β–SD–MA Monomerinin Yüzey Morfolojileri

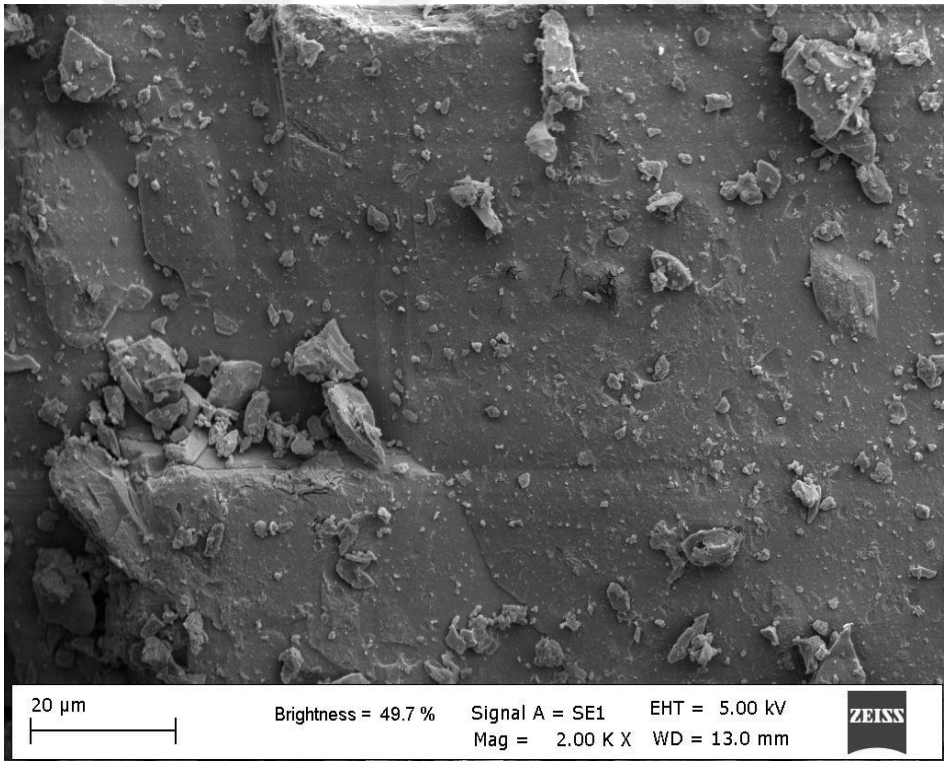
Kapsülleme ve sentez süreçlerinin istenen sonuçları verip vermediğini teyit etmek için elde edilen kapsüller ve metakrilatlı ürünler SEM kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.10'da β–SD, Şekil 4.11'de liyofilize KÇK ekstraktı, Şekil 4.12'de KÇK–β–SD enkapsülatı ve Şekil 4.13'te β–SD–MA'nın SEM görüntüleri gösterilmektedir. Örneklerin SEM görüntüleri 1000X ve 2000X büyütme ile görüntülenmiştir.

β–SD yapısal olarak düzenli bir yapıya ve boyuta sahip olmadığı, yönelim açısından da düzensiz bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir (Krishnaswamy, Orsat ve Thangavel, 2012). Dolayısıyla alınan SEM görüntüleri doğrultusunda dikdörtgenimsi bir yapıyı çağrıştırdığı ve boyutsal, yönelim açısından düzensiz olduğu görülmektedir (Şekil 4.10). Hazırlanan %100 etanol içerikli KÇK ekstraktı liyofilizatör yardımıyla dondurarak kurutulmuş ve SEM görüntülerinde de görüldüğü gibi yüzeyde çatlak yapılar oluşmuştur (Şekil 4.11). Elde edilen toz ekstraktlar küçük pulumsu yapılar sergilemiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), sentezlenen inklüzyon komplekslerinin karakterizasyonu için başvurulan yöntemlerden biridir. Partiküllerin şekil ve boyutlarındaki değişiklikler ve farklılıklar inklüzyon komplekslerinin sentezinde yorumlanma için kilit parametrelerdir. Aynı zamanda kompleksin çözünürlüğündeki değişiklikler de bir parametre olarak bilinmektedir. Sentezlenen inklüzyon kompleksinin SEM görüntüleri (Şekil 4.12) incelendiği zaman liyofilize KÇK ekstraktının yüzeyinde bulunan küçük pulumsu yapıların β–SD yüzeyinde de var olduğu ve miktarsal ve boyutsal olarak arttığı gözlenmektedir. Bu doğrultuda enkapsülasyon işleminin doğru olabileceği yorumu yapılabilmektedir. Çalışmanın son kısmı olarak sentezlenen β–SD–MA monomerinin SEM görüntüleri (Şekil 4.13) incelendiği zaman ise β–SD yüzeyi üzerindeki kısmi pürüzsüzlüğün yok oluşu ve yerini kümelenmiş yapılara bıraktığı gözlenmiştir. Yapı üzerindeki pulumsu yapılar sentez sırasında gerçekleşen sıcaklık değişiminden kaynaklı reaksiyona giremeyen küçük bir miktar β–SD'i ifade etmektedir. Pulumsu yapılar dışında kalan kümelenmiş yapıların varlığı ise β–SD–MA monomerinin oluşumunu göstermektedir. Çalışma sonucu olarak ise β–SD–MA sentezinin gerçekleştirilebilecek bir yöntem olarak literatüre kazandırılabileceği ifade edilebilmektedir.

A

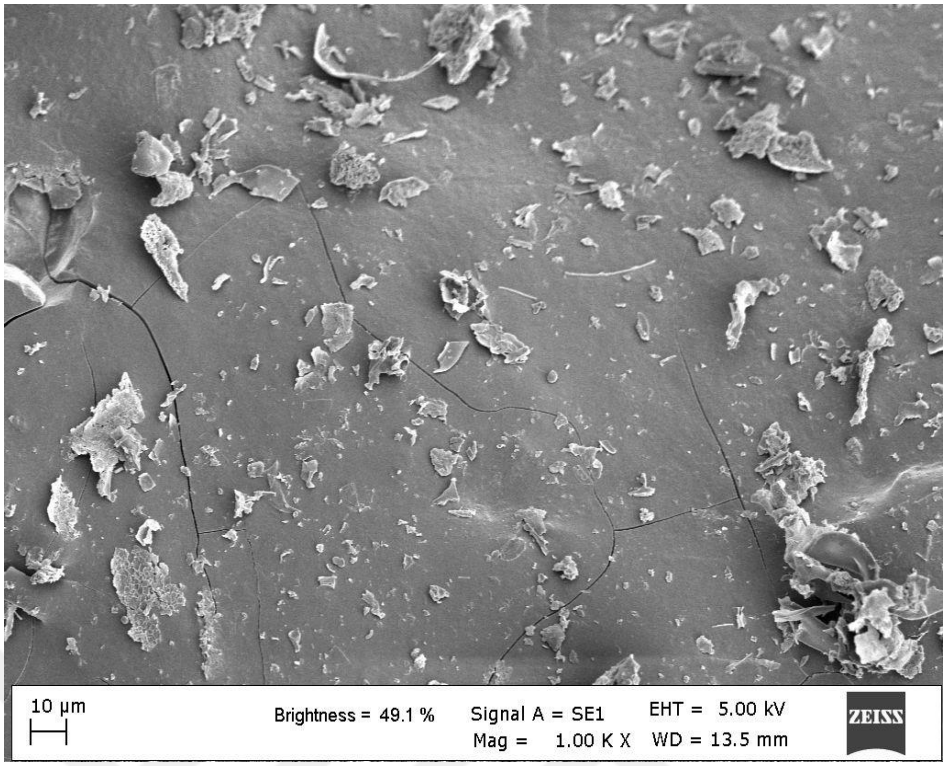


B

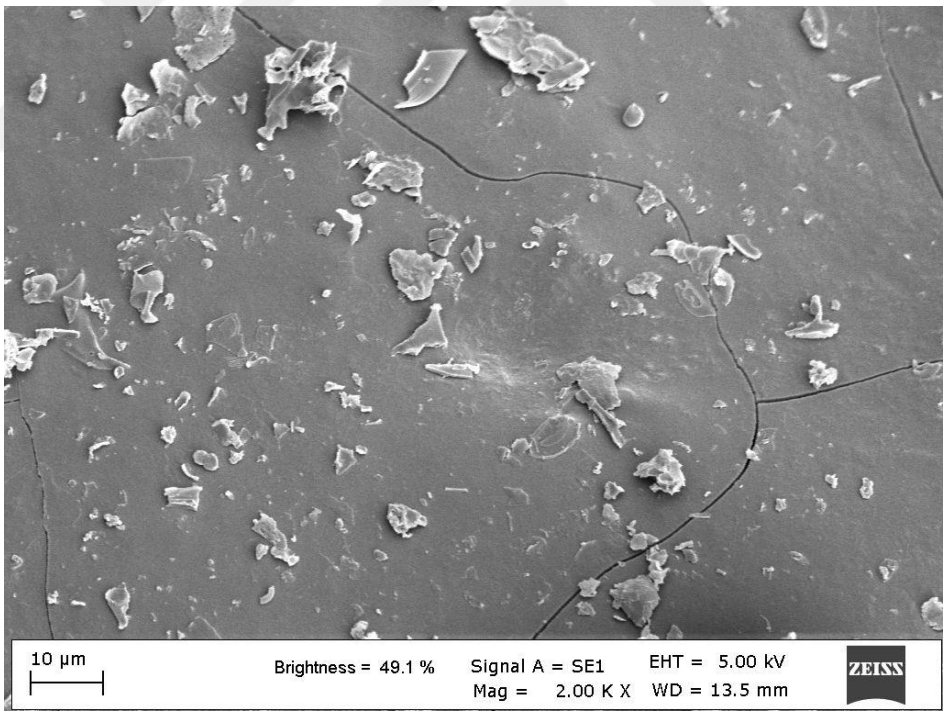


Şekil 4.10. β–SD SEM görüntüleri (A: 1000X büyütme, B: 2000X büyütme)

A

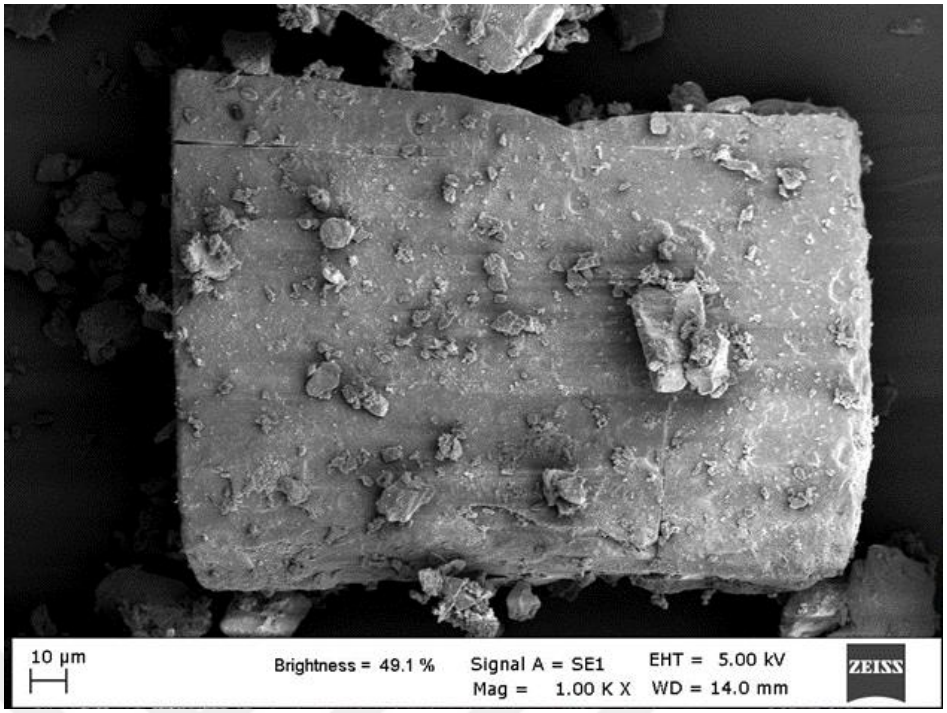


B

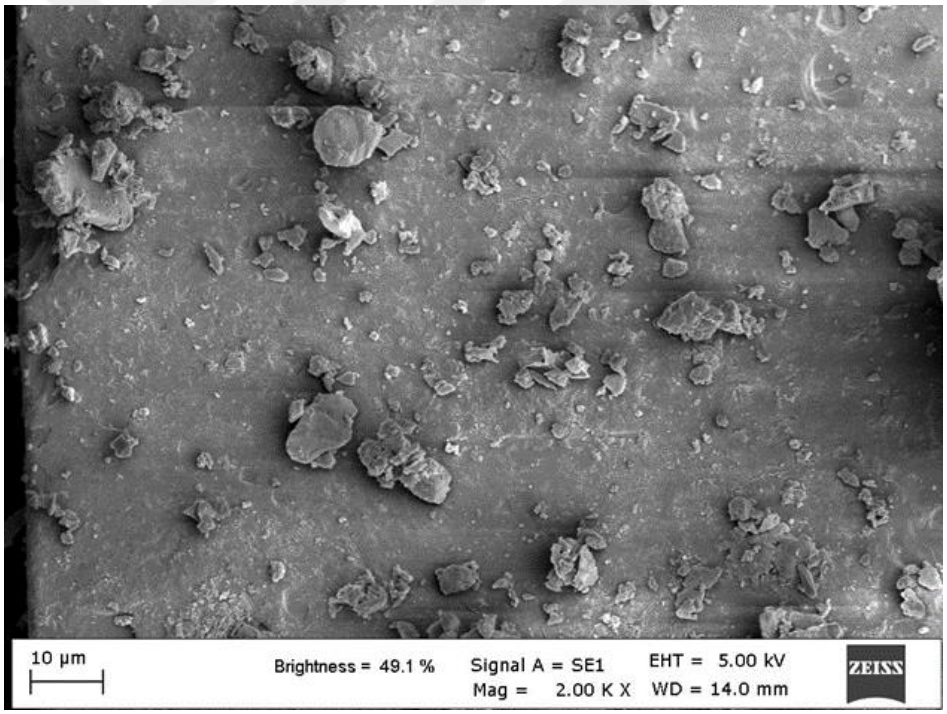


Şekil 4.11. Liyofilize KÇK ekstraktı SEM görüntüleri (A: 1000X büyütme, B: 2000X büyütme)

A

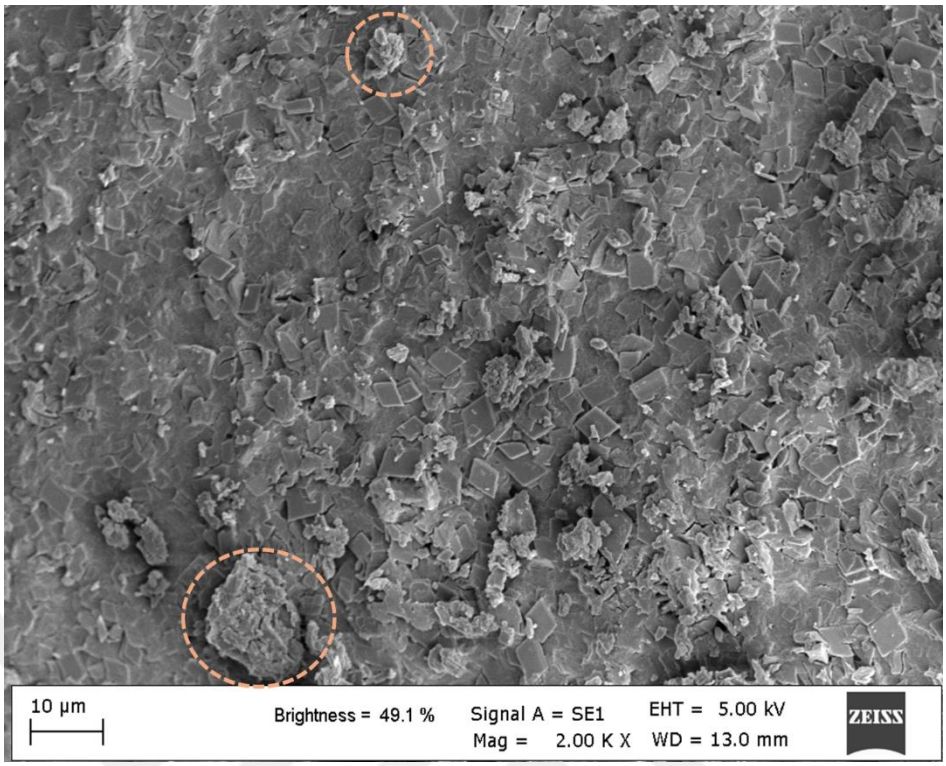


B

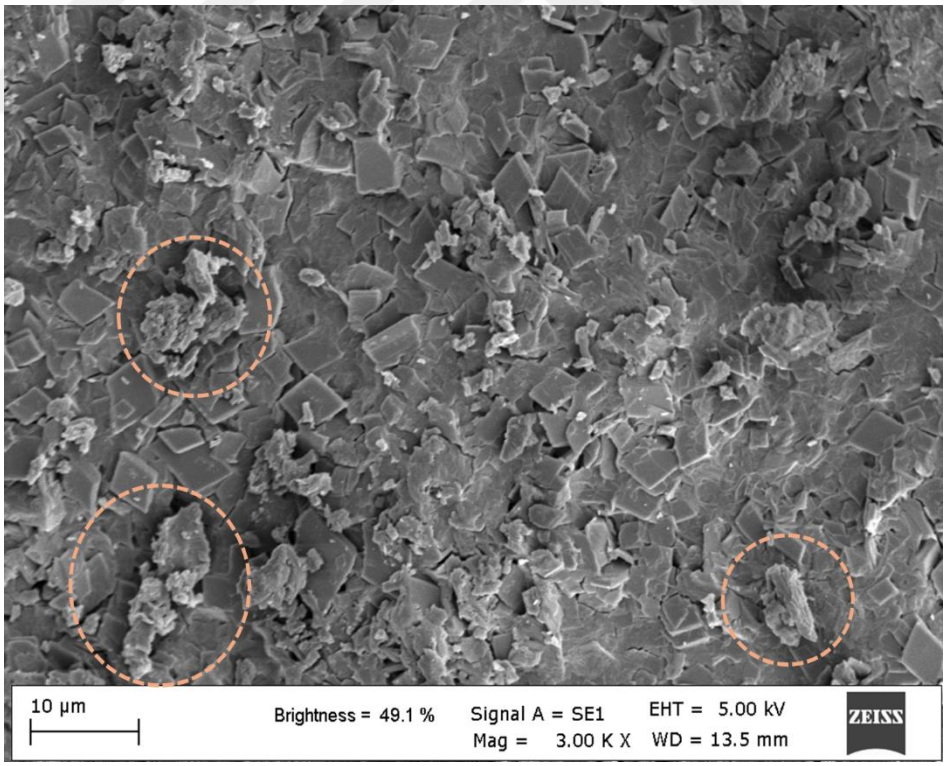


Şekil 4.12. KÇK–β–SD SEM görüntüleri (A: 1000X büyütme, B: 2000X büyütme)

A



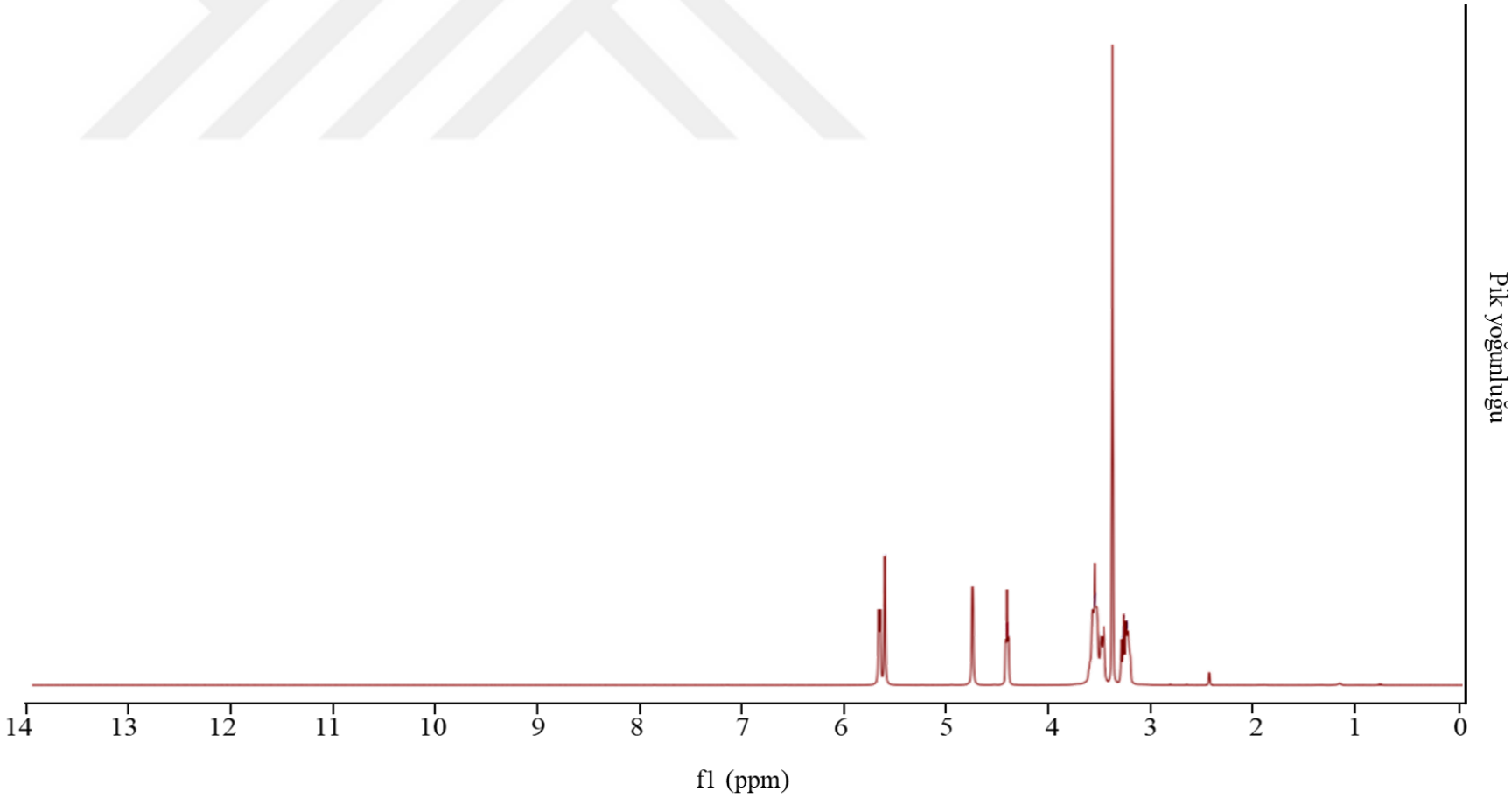
B



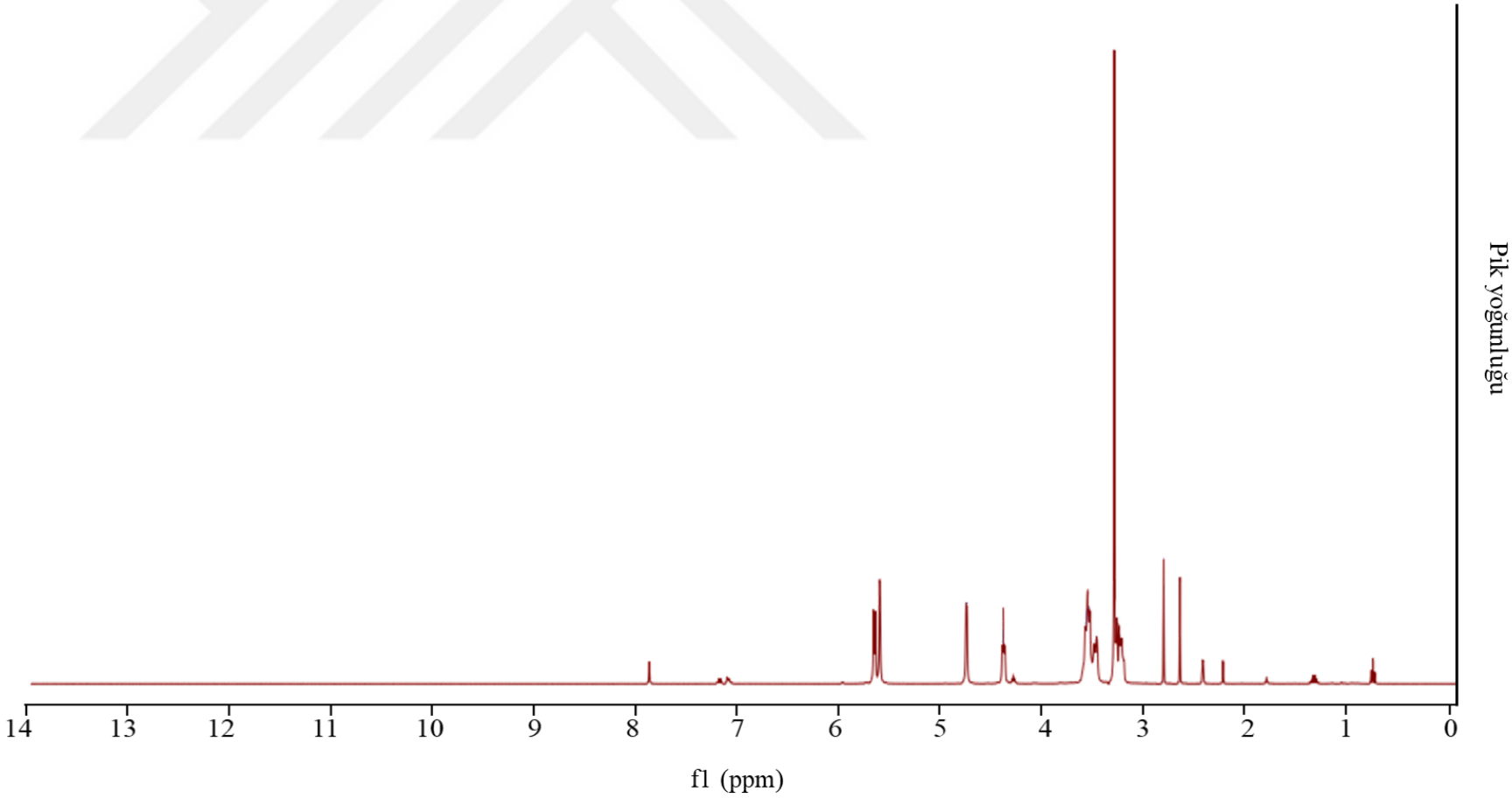
Şekil 4.13. β–SD–MA SEM görüntüleri (A: 2000X büyütme, B: 3000X büyütme)

4.8. β–SD ve β–SD–MA Monomerinin NMR Analizleri

β-SD-MA monomeri, metakriloil klorür, trietilaminin ve β–SD ile reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir. Sentezlenen monomerin kimyasal yapısının karakterizasyonu için NMR analizi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.8'de belirtildiği şekilde β-SD'nin metakrilat grupları ile modifiye edilmesi sonucu elde edilen β–SD–MA'nın varlığı ^{1}H–NMR ile doğrulanmıştır. DMSO–d_6 çözücü ortamında analize hazırlanan β–SD ve β–SD–MA 0–14 ppm aralığında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.14 (β–SD) ve Şekil 4.15'te (β–SD–MA) belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre metakrilat gruplarının metil protonlarına ait 1,85 ppm civarında sinyal tespit edilmiştir. Metakrilat gruplarına ait metil protonlarının sinyalleri doğrultusunda β–SD'nin 1 numaralı protonunu temsil eden sinyaller 4,80 ppm civarında tespit edilmiştir. β–SD'nin 2 ve 3 numaralı hidroksit grupları ile metakrilat gruplarının 8 ve 9 numaralı protonlarının örtüşmesi sonucu 5,67-6,03 ppm aralığında sinyaller tespit edilmiştir. β–SD'nin bünyesinde bulunan 6 numaralı birincil $^{-}$OH grupları daha fazla nükleofiliktir (Song ve diğerleri, 2021). Dolayısıyla modifikasyona en fazla maruz kalan gruptur. Bu nedenle metakrilat gruplarının metil protonları ile β–SD'nin 6 numaralı birincil $^{-}$OH gruplarının bağlanma ihtimali daha fazladır.



Şekil 4.14. β–SD NMR spektrumu



Şekil 4.15. β–SD-MA NMR spektrumu

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye'de dahil olmak üzere özellikle ılıman iklim koşullarında yetişen *Pinaceae* familyasına ait kızılçam olarak bilinen *Pinus brutia* türünün kabukları kullanılmıştır.

Çalışma toplam dört ayrı basamak olacak şekilde tamamlanmıştır. İlk basamakta *Pinus brutia* kabukları çalışmaya uygun hale gelecek şekilde öğütülmüş ve homojenize edilmiştir. Ekstraksiyon için etanol, etanol-su, metanol ve metanol-su olmak üzere 4 farklı çözücü sistemi kullanılmıştır. Ekstraktlara spektroskopik analizler (toplam fenolik madde, ABTS-antioksidan kapasite, toplam flavonoid ve kondanse tanen) ve HPLC-DAD kullanılarak kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan spektroskopik analizler sonucu toplam fenolik madde miktarı (500,15±6,69 mg GAE/g örnek) ve ABTS (258,37±0,63 mg TE/g örnek) antioksidan kapasite miktarı metanol-su ekstraktında, toplam flavonoid miktarı (4,19±0,05 mg QE/g örnek) etanol-su ekstraktında, kondanse tanen miktarı ise (359,56±38,69) mg CAE/g örnek) metanol ekstraktında en yüksek bulunmuştur. Kromatografik analizler sonucunda ise protokatekuik asit, epigallokateşin, kateşin, epikateşin, epigallokateşin gallat, epikateşin gallat, proantosiyanidin A2, hesperidin ve kuersetin fenolik bileşenleri tespit edilmiştir. Ekstrakt türleri karşılaştırıldığında genel anlamda bileşenlerin metanol-su çözücü sistemi ile daha iyi ekstrakte edildiği tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında inklüzyon kompleksi elde etmek için optimizasyon yöntemlerinden biri olan merkezi kompozit dizayn-yüzey yanıt metodolojisi tekniği kullanılarak enkapsülasyon parametreleri optimize edilmiştir. β-SD oranı, KÇK ekstrakt hacmi ve enkapsülasyon süresi enkapsülasyon parametreleri olarak belirlenmiştir. Toplamda 30 farklı deney sonunda enkapsülasyon etkinliği mg GAE/g örnek olacak şekilde toplam fenolik madde cinsinden hesaplanarak enkapsülasyon etkinlikleri belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar şu şekildedir: β-SD oranı %9,76 (% w/v), sıcaklık 33,57ºC, KÇK ekstrakt hacmi 2,11 mL, enkapsülasyon süresi 52,33 dk. Tespit edilen optimum koşullarda gerçekleştirilen enkapsülasyon işlemi sonrası enkapsülasyon etkinliği için tahmini değer %93,31 iken deneysel değer %90,45±1,34 mg GAE/g örnek

olarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon için geliştirilmiş olan modelin %95 güven aralığında tercih edilebilir bir model olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın üçüncü basamağında, KÇK ekstraktı KÇK–β–SD enkapsülatındaki fenolik bileşenlerin ve ardışık *in-vitro* gastrointestinal ortamdaki salım davranışları incelenmiştir. KÇK–β–SD enkapsülatındaki fenolik bileşenlerin salımının KÇK ekstraktındaki fenolik bileşenlerin salımından daha az olduğu gözlenmiştir. Ortamlar arası karşılaştırma yapıldığı zaman toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite açısından yüksek pH içeriğine sahip ortamlarda toplam fenolik madde içeriğinin daha yüksek olduğu, düşük pH içeriğine sahip ortamlarda ise daha düşük olduğu gözlenmiştir. Antioksidan kapasitesinin salımının ortamın pH'sine göre fenolik bileşenlerde bulunan hidroksil gruplarının SGF'den SIF'ye geçişleri sırasında yapılarda değişikliğe uğramasına, yani antioksidan kapasite değerinin artmasını sağladığı görülmektedir.

Çalışmanın dördüncü basamağında ise β–SD, metakrilat grupları ile modifiye edilip β–SD–MA monomeri sentezlenmiştir. Sentezlenen monomerin ve elde edilen enkapsülatın karakterize edilmesi için FT–IR, SEM analizleri gerçekleştirilmiş, sentezlenen monomerin karakterizasyonu için ayrıca NMR analizleri de gerçekleştirilmiştir. FT–IR analizi sonuçlarına göre β–SD'nin karakteristik pikleri gözlenmiş, metakrilat ile modifiye edilmiş β–SD'nin ise spektrumda yeni bir pik oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. KÇK ekstraktının β–SD ile enkapsülasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği, yapıyı bozmadığı sonucuna varılmıştır. SEM analizi sonuçlarına göre liyofilize KÇK ekstraktı ile oluşturulan inklüzyon kompleksinin görüntülerinde β–SD yüzeyinde boyutsal ve miktarsal olarak pulumsu yapılarda artış olduğu gözlenmiştir. İki ayrı bileşeninde yapısında gözle görülür büyük değişikliklerin oluşmaması inklüzyon kompleksinin oluştuğunu göstermektedir. β–SD'nin metakrilat gruplarının varlığı sonucu elde edilen β–SD–MA monomerinin SEM görüntüleri incelendiği zaman ise β–SD yapısının genel anlamda korunduğu ancak yüzeyde farklı düzensizlikte pulumsu yapıların mevut olduğu gözlenmiştir. Bu durumda reaksiyon sırasındaki sıcaklık farklılığından kaynaklı reaksiyona girememiş metakrilat gruplarının varlığı olduğu söylenebilir. Ancak genel anlamda yapıda gözlenen kümelenmiş yapıların varlığı ve devamında incelenen NMR ve FT–IR analiz sonuçları doğrultusunda β–SD–MA sentezinin gerçekleşmiş olduğu

yorumu yapılabilmektedir. NMR sonuçlarına bakıldığı zaman ise sentezlenen β–SD–MA monomerinin spektrumu literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında uyum içerisinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm çalışmalar göz önünde bulundurularak literatürde de belirtildiği gibi yara iyileştirici, antimikrobiyal vb. aktivitelere sahip olduğu bilinen çamgiller familyasına ait kızılçam türünde bulunan fenolik bileşiklerinin düşük çözünürlüklerinin inklüzyon kompleksi sayesinde arttırılabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmanın devamında yapılan monomer sentezinin ise en çok bilinen özelliği yapışkanlık özelliğidir. Dolayısıyla yapılması planlanan dental adeziv katkı maddesi olarak kullanılabilirliği için monomerin sentez yöntemi yapısal karakterizasyon yoluyla aydınlatılmıştır. İlerleyen basamak olarak biyoaktif materyal içerecek şekilde hazırlanan monomerin dental adeziv katkı maddesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abarca, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry, 196,* 968-975. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023

Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2020, Şubat 1). Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules,* C. 10. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/biom10020221

Agrawal, R., & Gupta, V. (2012). Cyclodextrins-A Review on Pharmaceutical Application for Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Frontier Research, 2*(1), 95-112. Geliş tarihi gönderen http://www.ijpfr.com

Aktaş Karaçelik, A., Şeker, M. E., & Karaköse, M. (2022). Determination of Antioxidant Activity of Different Extracts From Bark of Pinus spp. grown in Giresun (Turkey) Province – Phenolic analysis by RP-HPLC-DAD. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, *25*(1), 10-18. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.875313

Apetrei, C. L., Tuchilus, C., Aprotosoaie, A. C., Oprea, A., Malterud, K. E., & Miron, A. (2011). Chemical, antioxidant and antimicrobial investigations of pinus cembra L. bark and needles. *Molecules*, *16*(9), 7773-7788. https://doi.org/10.3390/molecules16097773

Atak, E., & Uslu, M. E. (2018). Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, *3*(27), 39-48.

Bai, C. C., Tian, B. R., Zhao, T., Huang, Q., & Wang, Z. Z. (2017, Eylül 1). Cyclodextrin-catalyzed organic synthesis: Reactions, mechanisms, and applications. *Molecules,* C. 22. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules22091475

Bansal, A. K., Baheti, A., Kumar, L., & Bansal, A. K. (2016). Excipients used in lyophilization of small molecules. *Journal of Excipients and Food chemicals,* 41-54. Geliş tarihi gönderen https://www.researchgate.net/publication/45718454

Bonthagarala, B., Rajendra Kumar, M. A., Kumar, A. R., Ashok, K., Nama, S., & Baburao, C. (2013). The cyclodextrins: A review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, *2*(2), 291-304. Geliş tarihi gönderen https://www.researchgate.net/publication/255763196

Bouyahya, A. , O. N. E. , B. S. , H. N. E. , B. A. , W. P. , & M. M. S. (2022). Advances in Dietary Phenolic Compounds to Improve Chemosensitivity of Anticancer Drugs. *Cancers*, *14(19)*. https://doi.org/10.3390/cancers14194573

Cabrera-Quiñones, N. C., López-Méndez, L. J., & Guadarrama, P. (2023). Inclusion and Non-Inclusion Complexes between Curcumin and β-Cyclodextrin with High-Curcumin Loading and Enhanced Aqueous Solubility Obtained by Mechanochemistry. *ChemistrySelect*, *8*(45). https://doi.org/10.1002/slct.202303254

Chammam, A., Fillaudeau, L., Romdhane, M., & Bouajila, J. (2024). Comparative Analysis of Pinus halepensis, Pinus brutia, and Pinus pinea Extracts: Chemical Composition and in vitro Bioactivities Amel CHAMMAM INSA Toulouse Luc FILLAUDEAU INSA Toulouse Mehrez ROMDHANE Universite de Gabes jaloul bouajila. *Researchsquare*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3822629/v1

Chen, H., Li, L., Ma, Y., Mcdonald, T. P., & Wang, Y. (2019). Development of active packaging film containing bioactive components encapsulated in β-cyclodextrin and its application. *Food Hydrocolloids*, *90*, 360-366. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.043

Cosme, P., Rodríguez, A. B., Espino, J., & Garrido, M. (2020, Aralık 1). Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants*, C. 9, ss. 1-20. MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox9121263

Couto, V. M., de Oliveira-Nascimento, L., Cabeça, L. F., Geraldes, D. C., Costa, J. S. R., Riske, K. A., … de Paula, E. (2020). Capsaicin-cyclodextrin complex enhances mepivacaine targeting and improves local anesthesia in inflamed tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 1-17. https://doi.org/10.3390/ijms21165741

Cretu, E., Karonen, M., Salminen, J. P., Mircea, C., Trifan, A., Charalambous, C., … Miron, A. (2013). In vitro study on the antioxidant activity of a polyphenol-rich extract from pinus brutia bark and its fractions. *Journal of Medicinal Food*, *16*(11), 984-991. https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0050

Crini, G. (2014, Kasım 12). Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, C. 114, ss. 10940-10975. American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/cr500081p

Crini, G. (2020, Haziran 1). The contribution of Franz Schardinger to cyclodextrins: a tribute on the occasion of the centenary of his death. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, C. 97, ss. 19-28. Springer. https://doi.org/10.1007/s10847-020-00990-3

de Almeida Magalhães, T. S. S., de Oliveira Macedo, P. C., Pacheco, S. Y. K., da Silva, S. S., Barbosa, E. G., Pereira, R. R., … de Lima, Á. A. N. (2020). Development and evaluation of antimicrobial and modulatory activity of inclusion complex of euterpe oleracea mart oil and β-cyclodextrin or HP-β-cyclodextrin. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3). https://doi.org/10.3390/ijms21030942

Del Valle, E. M. M. (2004, Mayıs 31). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, C. 39, ss. 1033-1046. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9

Demirtas, A., Musa, S. A. A., Salgirli-Demirbas, Y., Ozturk, H., Pekcan, M., Toprak, N. N., … Emre, M. B. (2021). The effects of Pinus brutia bark extract on pure and mixed continuous cultures of rumen bacteria and archaea, and fermentation characteristics in vitro. *Veterinarski Arhiv*, *91*(5), 523-535. https://doi.org/10.24099/VET.ARHIV.1036

Dıg, M., & Hakkı Alma, M. (1999). Antimicrobial Activities of Several Parts of Pinus brutia, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, Cedrus libani and Pinus nigra. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *13(7)*, 584-587. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199911)13:7<584::AID-PTR508>3.0.CO;2-S

Dubey, S., Mody, N., Sharma, R., Agrawal, U., & Vyas, S. P. (2016). Nanobiomaterials: Novel nanoplatforms for protein and peptide delivery. Içinde *Nanobiomaterials in drug delivery* (ss. 111-146). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00004-6

Dziedziński, M., Kobus-Cisowska, J., Szymanowska-Powałowska, D., Stuper-Szablewska, K., & Baranowska, M. (2020). Polyphenols composition, antioxidant and antimicrobial properties of Pinus sylvestris L. shoots extracts depending on different drying methods. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *32*(3), 229-237. https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i3.2080

Eghbal, N., & Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT, 90*, 254-264. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036

Ekiz, E. (2023). *Kızılçam (Pinus brutia) ve Karaçam (Pinus nigra) Kabuklarıyla Zenginleştirilen Ekmeklerin Besinsel ve Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi*.

Erdem, F., Gündoğan, E. N., Yılmaz, M. S., Sezgin, İ., Summakoğlu, Y., & Şakıyan Demirkol, Ö. (2021). Kuşburnu (Rosa canina) Fenolik Bileşiklerinin Mikroenkapsülasyonu. *Gıda, 46*(4), 1026-1039. https://doi.org/10.15237/gida.gd21046

Erken, İ., Şahin, S., Karkar, B., Akça, B., & Özakın, C. (2022). Chitosan based edible film incorporating different Prunella L. extracts, characterization and their antioxidant properties. *Journal of Food Processing and Preservation, 46*(7). https://doi.org/10.1111/jfpp.16658

Ertaş, O., Dönmez, B., Konyalıoğlu, S., & Sogut, O. (2018). Research on the Composition and Cytotoxic Activity of Pinus brutia gum. *HEALTH SCIENCES QUARTERLY, 2*(1), 39-48. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91253-2.00005-4

Escobar, K., Garrido-Miranda, K. A., Pulido, R., Naveas, N., Manso-Silván, M., & Hernandez-Montelongo, J. (2023). Coatings of Cyclodextrin/Citric-Acid Biopolymer as Drug Delivery Systems: A Review. *Pharmaceutics, 15*(1). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010296

Escobar-Avello, D., Avendaño-Godoy, J., Santos, J., Lozano-Castellón, J., Mardones, C., von Baer, D., … Gómez-Gaete, C. (2021). Encapsulation of phenolic compounds from a grape cane pilot-plant extract in hydroxypropyl beta-cyclodextrin and maltodextrin by spray drying. *Antioxidants, 10*(7). https://doi.org/10.3390/antiox10071130

Esteso, M. A., & Romero, C. M. (2024, Nisan 1). Cyclodextrins: Properties and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 25. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms25084547

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013, Mart 1). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food*

and Bioprocess Technology, C. 6, ss. 628-647. Springer Science and Business Media, LLC. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0

Feng, Y., Chen, S., Li, Z., Gu, Z., Xu, S., Ban, X., … Li, C. (2023). A review of controlled release from cyclodextrins: release methods, release systems and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, C. 63, ss. 4744-4756. Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2007352

Fernández-Quiroz, D., Tohidi, M. M., Paymard, B., & Lucero-Acuña, A. (2023). Immobilization of essential oils in biopolymeric matrices: recent approaches for controlled delivery systems. *Studies in Natural Products Chemistry, 78*, 365-401. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91253-2.00005-4

Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., & Pereira, Z. V. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in Psychotria leaf extracts. *Antioxidants*, *3*(4), 745-757. https://doi.org/10.3390/antiox3040745

Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., & Nirgude, P. S. (2015). Lyopilization / Freeze Drying-A Review. *Kunal et al. World Journal of Pharmaceutical Research World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor 5*, *4*(8), 517. Geliş tarihi gönderen www.wjpr.net

Ghosh, S., Sarkar, T., Das, A., & Chakraborty, R. (2021, Kasım 1). Micro and Nanoencapsulation of Natural Colors: a Holistic View. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, C. 193, ss. 3787-3811. Springer. https://doi.org/10.1007/s12010-021-03631-8

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *50*, 213-224. https://doi.org/10.1080/096374899101256

Gök, H. N., Gül, H., Gülfraz, M., Asad, M. J., Öztürk, N., Şanal, F., & Orhan, İ. E. (2021). Preclinical study on the hepatoprotective effect of pollen extract of pinus brutia ten. (red pine) in mice and phenolic acid analysis. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, *18*(3), 319-325. https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.47154

Guri, A., Kefalas, P., & Roussis, V. (2006). Antioxidant potential of six pine species. *Phytotherapy Research*, *20*(4), 263-266. https://doi.org/10.1002/ptr.1848

Ho, T., Keijiiterao, H., & Bhandarii, B. (2021). Functionality offCyclodextrins in Encapsulation forrFood Applications. Içinde *Springer International Publishing*.

İlter, I., Koç, M., Demirel, Z., Conk Dalay, M., & Kaymak Ertekin, F. (2022). Microencapsulation of phycocyanin by spray-drying method: Effect of process parameters and wall materials. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(4). https://doi.org/10.1111/jfpp.16434

Ince, I., Yesil-Celiktas, O., Karabay-Yavasoglu, N. U., & Elgin, G. (2009). Effects of Pinus brutia bark extract and Pycnogenol® in a rat model of carrageenan induced inflammation. *Phytomedicine*, *16*(12), 1101-1104. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.004

Jakubczyk, K., Melkis, K., Janda-Milczarek, K., & Skonieczna-Żydecka, K. (2024). Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Fermented Beetroot Juices Enriched with Different Additives. *Foods*, *13*(1). https://doi.org/10.3390/foods13010102

Jansook, P., Ogawa, N., & Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *535*(1-2), 272-284. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018

Jemli, S., Pinto, D., Kanhounnon, W. G., Ben Amara, F., Sellaoui, L., Bonilla-Petriciolet, A., … Badawi, M. (2023). Green β-cyclodextrin nanosponges for the efficient adsorption of light rare earth elements: Cerium and lanthanum. *Chemical Engineering Journal*, *466*. https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143108

Jiménez-Villeda, B. E., Falfán-Cortés, R. N., Rangel-Vargas, E., Santos-López, E. M., Gómez-Aldapa, C. A., Torres-Vitela, Ma. R., … Castro-Rosas, J. (2023). Synbiotic Encapsulation: A Trend towards Increasing Viability and Probiotic Effect. *Journal of Food Processing and Preservation*, *2023*, 1-20. https://doi.org/10.1155/2023/7057462

Jo, Y. J., Cho, H. S., & Chun, J. Y. (2021). Antioxidant activity of β-cyclodextrin inclusion complexes containing trans-cinnamaldehyde by DPPH, ABTS and FRAP. *Food Science and Biotechnology*, *30*(6), 807-814. https://doi.org/10.1007/s10068-021-00914-y

Karkar, B. (2024a). *Article in Food and Health*. https://doi.org/10.3153/FH24010

Karkar, B. (2024b). The effect of amaranth, a pseudo-cereal, on the activity of L. acidophilus probiotic bacteria and its antioxidant activity in the gastrointestinal digestion process. *Food and Health*, *10*(2), 104-114. https://doi.org/10.3153/fh24010

Karkar, B., Patır, İ., & Şahin, S. (2023). Development of galangin-loaded nano-sized polyelectrolyte liposome: optimization and characterization. *Polymer Bulletin*, *81*(4), 2847-2867. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00289-023-04826-1

Karkar, B., & Şahin, S. (2022). Determination of phenolic compounds profiles and antioxidant properties of oleaster (Elaeagnus angustifolia L.) grown in Turkey. *European Food Research and Technology*, *248*(1), 219-241. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03875-y

Karkar, B., Şahin, S., Bekiz, D., Akça, B., & Özakın, C. (2023). Evaluation of antioxidant films of chitosan with Aquilaria agallocha extract as packaging material. *Journal of Food Science*, *88*(6), 2571-2582. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16613

Kettel, M. J., Schaefer, K., Pich, A., & Moeller, M. (2016). Functional PMMA nanogels by cross-linking with cyclodextrin methacrylate. *Polymer*, *86*, 176-188. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.01.063

Kivrak, İ., Kivrak, Ş., Harmandar, M., & Çetintaş, Y. (2013). Phenolic Compounds of Pinus brutia Ten.: Chemical Investigation and Quantitative Analysis Using an Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Electrospra Phenolic Compounds of Pinus brutia Ten.: Chemical Investigation and Quantitative Analysis Using an Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization Source. Içinde *Rec. Nat. Prod* (C. 7). Geliş tarihi gönderen www.acgpubs.org/RNP

Kong, F., Su, Z., Zhang, L., Qin, Y., & Zhang, K. (2019). Inclusion complex of grape seeds extracts with sulfobutyl ether β-cyclodextrin: Preparation, characterization, stability and evaluation of α-glucosidase and α-amylase inhibitory effects in vitro. *LWT*, *101*, 819-826. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.007

Krishnaswamy, K., Orsat, V., & Thangavel, K. (2012). Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*, *111*(2), 255-264. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.024

Li, J., Hou, X., Jiang, L., Xia, D., Chen, A., Li, S., … Zhang, Z. (2022). Optimization and characterization of Sichuan pepper (Zanthoxylum bungeanum Maxim) resin microcapsule encapsulated with β-cyclodextrin. *LWT*, *171*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114120

Liu, L., & Guo, Q.-X. (2002). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 42*, 1-14.

Martin, J., Díaz-Montaña, E. J., & Asuero, A. G. (2018). Cyclodextrins: Past and Present. Içinde *Cyclodextrin - A Versatile Ingredient*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.72736

Matencio, A., Navarro-Orcajada, S., García-Carmona, F., & López-Nicolás, J. M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science and Technology*, *104*, 132-143. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.009

Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2022, Aralık 1). Host–Guest Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 23. MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms232415730

Merve BULDUR, P., & Kök, F. N. (2012). ENCAPSULATION OF FOOD FLAVORS VIA COACERVATION METHOD. *Current Opinion in Biotechnology*, 96. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.301

Milić, N., Milanović, M., Četojević-Simin, D., Malenčić, Đ., Prvulović, D., Pavkov, N., … Mandić, A. (2021). Phytochemical characterization and effects on cell proliferation of Pinus nigra Arn. bark. *Archiv der Pharmazie*, *354*(5). https://doi.org/10.1002/ardp.202000416

Morin-Crini, N., Fourmentin, S., Fenyvesi, É., Lichtfouse, E., Torri, G., Fourmentin, M., & Crini, G. (2021, Haziran 1). 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture, and the industry: a review. *Environmental Chemistry Letters*, C. 19, ss. 2581-2617. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s10311-020-01156-w

Niño-Vásquez, I. A., Muñiz-Márquez, D., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., & Flores-Gallegos, A. C. (2022). Co-microencapsulation: a promising multi-approach technique for enhancement of

functional properties. *Bioengineered*, C. 13, ss. 5168-5189. Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2037363

Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020, Ekim 18). The freeze-drying of foods⇔the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, C. 9. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/foods9101488

Ozkan, G., Kostka, T., Dräger, G., Capanoglu, E., & Esatbeyoglu, T. (2022). Bioaccessibility and transepithelial transportation of cranberrybush (Viburnum opulus) phenolics: Effects of non-thermal processing and food matrix. *Food Chemistry*, *380*, 132036. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.132036

Ozkan, G., Sakarya, F. B., Tas, D., Yurt, B., Ercisli, S., & Capanoglu, E. (2023). Effect of In Vitro Digestion on the Phenolic Content of Herbs Collected from Eastern Anatolia. *ACS omega*, *8*(14), 12730-12738. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07881

Öztürk, E., & Temiz, U. (2018). Encapsulation Methods and Use in Animal Nutrition. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, *32*(3), 624-631. https://doi.org/10.15316/sjafs.2018.145

Pandey, S. P., Shukla, T., Dhote, V. K., Mishra, D. K., Maheshwari, R., & Tekade, R. K. (2018). Use of polymers in controlled release of active agents. Içinde *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (ss. 113-172). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00004-2

Panzella, L., & Napolitano, A. (2022, Ocak 26). Condensed Tannins, a Viable Solution to Meet the Need for Sustainable and Effective Multifunctionality in Food Packaging: Structure, Sources, and Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, C. 70, ss. 751-758. American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07229

Parcheta, M., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Akimowicz, M., Choińska, R., & Lewandowski, W. (2021, Nisan 2). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials*, C. 14. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ma14081984

Pastor-Villaescusa, B., Rodriguez, E. S., & Rangel-Huerta, O. D. (2018). Polyphenols in obesity and metabolic syndrome. Içinde *Obesity: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (ss. 213-239). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812504-5.00011-8

Peixoto, F. B., Raimundini Aranha, A. C., Nardino, D. A., Defendi, R. O., & Suzuki, R. M. (2022, Aralık 1). Extraction and encapsulation of bioactive compounds: A review. *Journal of Food Process Engineering*, C. 45. John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/jfpe.14167

Prajapati, B. G., Prajapati, V. D., Basu, B., Kendre, P. N., Mukherjee, S., Pal, T., … Dharmameher, J. B. (2023). Methods for nanoencapsulation. Içinde *Green sustainable process for chemical and environmental engineering and science* (ss. 59-108). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95171-5.00010-8

Prasanth, M. I., Sivamaruthi, B. S., Chaiyasut, C., & Tencomnao, T. (2019, Şubat 1). A review of the role of green tea (camellia sinensis) in antiphotoaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients*, C. 11. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu11020474

Radünz, M., Hackbart, H. C. D. S., Bona, N. P., Pedra, N. S., Hoffmann, J. F., Stefanello, F. M., & Da Rosa Zavareze, E. (2020). Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *192*. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111020

Ramos, P. A. B., Pereira, C., Gomes, A. P., Neto, R. T., Almeida, A., Santos, S. A. O., … Silvestre, A. J. D. (2022). Chemical Characterisation, Antioxidant and Antibacterial Activities of Pinus pinaster Ait. and Pinus pinea L. Bark Polar Extracts: Prospecting Forestry By-Products as Renewable Sources of Bioactive Compounds. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/app12020784

Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Iahtisham-Ul-Haq, Patel, S., Pan, X., … Rasul Suleria, H. A. (2019, Ağustos 1). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, C. 116. Elsevier Masson s.r.l. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Riseh, R. S., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Pour, M. M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021, Ekim 1). Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 22. MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms222011165

Rohilla, S. (2023, Aralık 1). A review on bioactive compounds and health benefits of Baccaurea ramiflora. *Food Bioengineering*, C. 2, ss. 339-349. John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/fbe2.12069

Saifullah, M., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Tanver Rahman, M. R., & Van Vuong, Q. (2019, Nisan 1). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science and Technology*, C. 86, ss. 230-251. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030

Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*, C. 23. MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules23051161

Scrob, T., Hosu, A., & Cimpoiu, C. (2019). The influence of in vitro gastrointestinal digestion of brassica oleracea florets on the antioxidant activity and chlorophyll, carotenoid and phenolic content. *Antioxidants*, *8*(7). https://doi.org/10.3390/antiox8070212

Semerci, A. B., & İnceçayir, D. (2020). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of some female cones of gymnosperm plant. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, *57*, 298-303.

Simpson, M. G. (2019). Evolution and Diversity of Woody and Seed Plants. Içinde *Plant Systematics* (ss. 131-165). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812628-8.50005-5

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158. https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144

Song, X., Mensah, N. N., Wen, Y., Zhu, J., Zhang, Z., Tan, W. S., … Li, J. (2021). β-Cyclodextrin-Polyacrylamide Hydrogel for Removal of Organic Micropollutants from Water. *Molecules, 26*(16). https://doi.org/10.3390/molecules26165031

Soni, S. S., Alsasa, A., & Rodell, C. B. (2021, Nisan 6). Applications of Macrocyclic Host Molecules in Immune Modulation and Therapeutic Delivery. *Frontiers in Chemistry*, C. 9. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.658548

Soukoulis, C., & Bohn, T. (2018). A comprehensive overview on the micro- and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(1), 1-36. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.971353

Szente, L., Szemán, J., & Sohajda, T. (2016). Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 130,* 347-365. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.009

Şahin, S., Eyüboğlu, S., Karkar, B., & Ata, G. D. (2024). Development of bioactive films loaded with extract and polysaccharide of Pinus brutia bark. *Journal of Food Science*. https://doi.org/10.1111/1750-3841.17095

Şahin, S., & Karkar, B. (2019). The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(7). https://doi.org/10.1111/jfbc.12888

Şeker, M. E., Çelik, A., Dost, K., & Erdoğan, A. (2021). Investigation of phenolic content in five different pine barks species grown in Turkey by HPLC-UV and LC-MS. *Journal of Chromatographic Science, 59*(6), 491-501. https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab022

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food chemistry*, *120*(2), 599-606. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.030

Tálos-Nebehaj, E., Albert, L., Visi-Rajczi, E., & Hofmann, T. (2019). Combined Multi-assay Evaluation of the Antioxidant Properties of Tree Bark. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*, *15*(2), 85-97. https://doi.org/10.2478/aslh-2019-0007

Tutun, S., & Yurdakul, O. (2022). Enkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, *13*(2), 99-119. https://doi.org/10.38137/vftd.1096571

Ucar, M. B., Ucar, G., Pizzi, A., & Gonultas, O. (2013). Characterization of Pinus brutia bark tannin by MALDI-TOF MS and 13C NMR. *Industrial Crops and Products*, *49*, 697-704. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.010

Ulukanlı, Z., Karabörklü, S., Bozok, F., Ateş, B., Erdoğan, S., Cenet, M., & Karaaslan, M. G. (2014). Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean Pinus brutia and Pinus pinea resin essential oils. Içinde *Chinese Journal of Natural Medicines* (C. 12).

ULUSU, F., & DARICI, C. (2023). The influence of tannins purified from Eastern Mediterranean Region plants (Pinus brutia Ten. and Quercus coccifera L.) on carbon mineralization: Antimicrobial and antimutagenic evaluation. *Anatolian Journal of Botany*, *7*(1), 60-69. https://doi.org/10.30616/ajb.1259084

Uzombah, T. A. (2022). The Implications of Replacing Synthetic Antioxidants with Natural Ones in the Food Systems. *Natural Food Additives*. https://doi.org/10.5772/intechopen.103810

Valerón, N. R., Vásquez, D. P., & Munk, R. (2021). The Pinaceae species, flavor attributes for new culinary spices. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *23*. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100306

Wilhelmy, C., Pavez, C., Bordeu, E., & Brossard, N. (2021). A Review of Tannin Determination Methods Using Spectrophotometric Detection in Red Wines and Their Ability to Predict Astringency. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *42*(1), 1-9. https://doi.org/10.21548/42-1-3852

Zahra, K. F., Lefter, R., Ali, A., Abdellah, E. C., Trus, C., Ciobica, A., & Timofte, D. (2021). The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, C. 2021. Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2021/9965916

Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019, Kasım 1). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology*, C. 56, ss. 4757-4774. Springer. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x

Zhou, J., Jia, J., He, J., Li, J., & Cai, J. (2022, Aralık 1). Cyclodextrin Inclusion Complexes and Their Application in Food Safety Analysis: Recent Developments and Future Prospects. *Foods*, C. 11. MDPI. https://doi.org/10.3390/foods11233871