

ALGINAT-PROPOLİS MİKROKAPSÜLLERİN *in vitro* SİNDİRİM SİSTEMİNDE SALINIMININ HAM PROPOLİS İLE KIYASLANMASI

Comparing the Release of Alginate-Propolis Micro Capsules in *In vitro* Digestion System with the Release of Raw Propolis

Merve KESKİN¹, Şaban KESKİN², Sevgi KOLAYLI¹

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon, Türkiye

²Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bilecik, Türkiye

Yazışma Yazarı / Corresponding Author: merveozdemirkeskin@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 28.07.2018

Kabul tarihi / Accepted: 15.09.2018

DOI:

ÖZ

Propolis, reçinemsî, suda az çözünen vizkoz, yapışkan, keskin kokulu doğal bir karışımdır. Reçinemsî yapısından dolayı ham propolisin biyoyararlılığı düşük olup, propolis çeşitli çözücüler ile muamele edilmekte ve ekstraktları halinde tüketilmektedir. Ekstrakt elde edilmek için bilinçsizce kullanılan çözücüler nedeniyle insan sağlığı tehlikeye sokulmaktadır. Çözücülerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için, çözücü bağımsız propolis yüklü alginat kapsüller elde edildi. Bu kapsüllerin *in vitro* sindirim sisteminde zamana bağlı olarak salınım oranlarının değişimi tespit edildi. Aynı şartlar altında ham propolisin salınım miktarı ile kıyaslandı. Kapsüllerin pH 7,4'e propolis aktif bileşenlerinin %95' inden fazlasını saldığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Mikrokapsül, Sindirim Sistemi, Alginat, Salınım Özellikleri

ABSTRACT

Propolis is a resinous, slightly soluble in water, viscous, sticky, odourous natural mixture. Bioefficacy of raw propolis is limited due to its resinous nature so it is treated with different solvent and consumed as extracts. Health of the consumer is put at risk because of unconsciously used solvents for preparing propolis extract. In this study, solvent free propolis loaded alginat microbeads were prepared in order to over come the bad effects of solvents. The release properties of these beads were temporally determined in simulated *in vitro* digestive system. Obtained results were compared with the data obtained under the same conditions for raw propolis. It was determined that propolis loaded alginate micro beads released about 95% of active components of propolis at pH 7.40.

Key words: Propolis, Microbead, Digestive System, Alginate, Release Properties

EXTENDED ABSTRACT

Objective: Propolis is a resinous natural mixtures collected and produced by honey bees. It has strong taste and aroma. The physical and chemical properties of propolis mainly depends on the area being collected and the method of the collection. It is rich in essential oils and phenolic components so it has high levels of antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-tumoral activity. Bioavailability of crude propolis is

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

limited because of its resinous nature. That is why it should be extracted. It is known that 70% ethanol is the best solvent for preparing propolis extract but other solvents like glycerol, glycol (s), tetrahydrofuran, Dimethylsulphoxide, olive oil etc. have been tested for preparing propolis extract. Some of these solvents including ethanol are harmful for human health. Encapsulation is a practical approach to overcome this problem. In the present study, propolis ethanol extract was encapsulated with sodium alginate and the solvent was removed from the beads by drying. By this way, ethanol free, consumable alginate microbeads containing propolis active compounds was achieved. The release properties of the beads in simulated digestive system was compared with the release properties of raw propolis. There is little work on bioavailability of raw propolis or propolis containing products. Main objective of this study is to compare the bioavailability of propolis alginate beads with the release of raw propolis.

Methods: *In vitro* digestive system was constituted by using simulated gastric and simulated intestinal fluid. For gastric system pH 1.50 HCl/KCl buffer and for intestinal system pH 7.40 phosphate buffer with 1% Tween 80 solutions were prepared respectively. Same amount of raw propolis and alginate-propolis beads (0.1500 g) were put in 30 mL of these solutions separately. Obtained mixtures were put in a bath at 37°C. Once every 30 min, 2 mL of solution was sampled out from the mixtures individually. The amount of total polyphenol in the samples was determined and the release of raw propolis and the beads were calculated as percentage value respectively. Folin–Ciocalteu method was used to determine the amount of total polyphenol in samples.

Results: While the release of phenolic compounds from raw propolis in both of the simulated system was found to be low as expected where as phenolic compounds in alginate-propolis microbeads was almost completely released in simulated intestinal system. It was also found that alginate-propolis microbeads were stable in simulated gastric system and little phenolic compounds were released.

Conclusion: It could be concluded that bioavailability of propolis active compounds was enhanced by preparing alginate–propolis microbeads.

GİRİŞ

Katı, sıvı ve gaz halinde bulunan materyallerin tüm özelliklerini koruyarak belirli koşullar altında kapsüller içerisine alınması ve kapsüllenen materyallerin kontrollü salınımının yapılmasının sağlanması enkapsülasyon teknikleri ile sağlanmaktadır (Nedovic ve ark., 2011; Deladino ve ark., 2008). Kaplanan materyal öz olarak adlandırılırken kaplamada kullanılan materyal ise taşıyıcı, kabuk veya enkapsülant olarak adlandırılmaktadır (Gharsallaoui, ve ark., 2007). Enkapsülasyon ile üretim veya depolama esnasında üründe meydana gelen fonksiyonellik kaybı, kötü aroma, koku oluşumu, yapı bozulması, aktivite kaybı gibi olumsuz etkiler azaltılabilir veya engellenebilirken; nem kontrolü, oksidasyona karşı koruma, aktif indirgenlerin korunması sağlanır ve biyoyararlılık artırılır (Keskin, 2018).

Propolis, çeşitli bitkilerin yaprak, tomurcuk, kabuk vb. kısımlarından işçi arılar tarafından toplanan, reçinensi, suda az çözünen vizkoz, yapışkan, keskin kokulu doğal bir karışımdır. Arılar kovanlarını her türlü fiziksel ve kimyasal tehdit ve tehlikeye karşı savunma, kovanlardaki çatlakları sıvama,

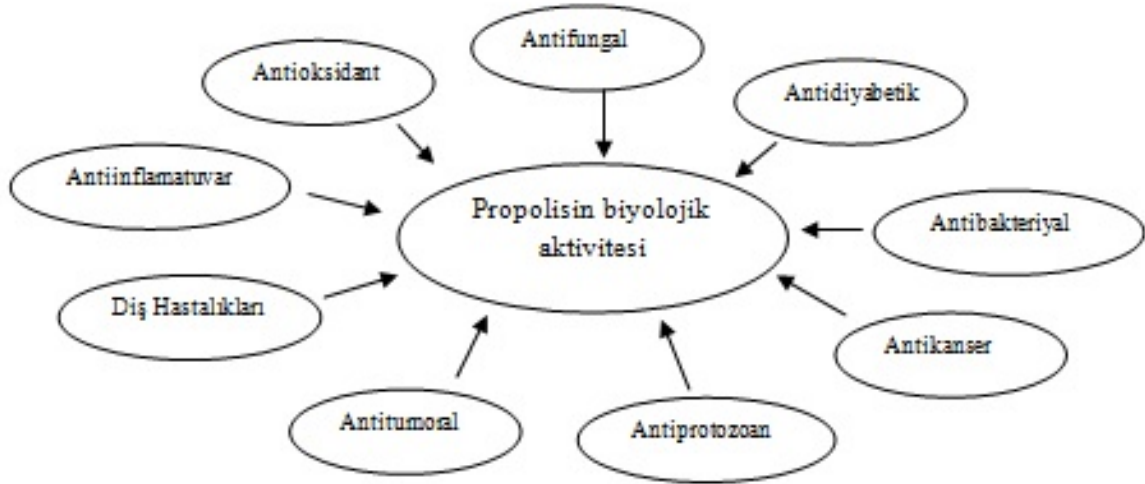
kovan girişini daraltarak yağmacı arıların girişini engelleme ve kovan iç sıcaklığını 35°C civarında tutma gibi birçok amaç için propolis toplamaktadırlar. Propolis içerdiği uçucu yağlar ve fenolik bileşikler nedeniyle yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitümöral özellikler sergilemektedir. Bu nedenle propolis eski çağlardan beri mumyalamada, vücudun enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmasını arttırmada ve yaraları kapatarak tedavi etmekte doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Ahn ve ark., 2007; Li ve ark., 2008; Aliyazicioglu ve ark., 2013). Propolisin biyolojik aktif özellikleri Şekil 1.' de özetlenmektedir (Pasupuleti ve ark., 2017).

Biyolojik olarak son derecede yüksek aktiviteye sahip olan bu doğal ürünün kullanılmasında en büyük sorun çözünürlüktür. Ham olarak tüketildiğinde reçinensi yapısından dolayı propolisin biyoyararlılığı düşüktür ve bu nedenle propolis çeşitli çözücüler ile muamele edilmekte ve ekstraktları halinde tüketilmektedir. Propolis için en ideal çözücünün %70 lik etanol olduğu bildirilmektedir, ancak etilalkol de propolis tüketimini sınırlandırmaktadır. Alkolsüz propolis ekstraktları ticari olarak veya merdiven altı diye tabir edilen

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

yollarla piyasaya arz edilmektedir. Ancak, bunların da içeriğinin bilinmemesi ve kullanılan çözücülerin sağlığa olumsuz etkileri gibi nedenlerden dolayı biyoyumlu propolis kapsüllerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu çalışma ile etanolik propolis ekstraktı alginat biyopolimeri ile iyonik

jelasyon tekniği kullanılarak enkapsüle edildi. Kapsüllerin biyoyararlılığı *in vitro* olarak yapay sindirim sistemi (mide, ince bağırsak) koşullarında ham propolis ve propolisli kapsüllerin salınım özelliklerinin karşılaştırılması ile incelendi.



Şekil 1. Propolisin biyolojik aktivitesi

Figure 1. Biological activity of propolis

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan reaktiflerden sodyum alginat Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany den, Tween 20 Fisher Bioreagents, USA'dan temin edildi. Çalışmada kullanılan propolis örneği 2017 yılında Bilecik ilinden tuzak ile toplanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer reaktifler analitik saflıktadır.

Propolis ekstraksiyonu

Propolis ekstraksiyonu maserasyon tekniğiyle gerçekleştirildi. Ekstraksiyonda katı sıvı oranı 1:10 olacak şekilde ayarlandı. Propolis örneği - 18°C'de dondurulduktan sonra toz haline getirildi. Daha sonra 3,1687 g ham propolis üzerine 30 mL %70'lik etanol ilave edildi ve 24 saat boyunca, sabit hız ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalandı. Süre sonunda elde edilen karışım Wattman 1 süzgeç

kâğıdı ile süzüldü. Süzüntü propolis ekstraktı olarak kullanıldı.

Alginat- propolis kapsüllerin eldesi

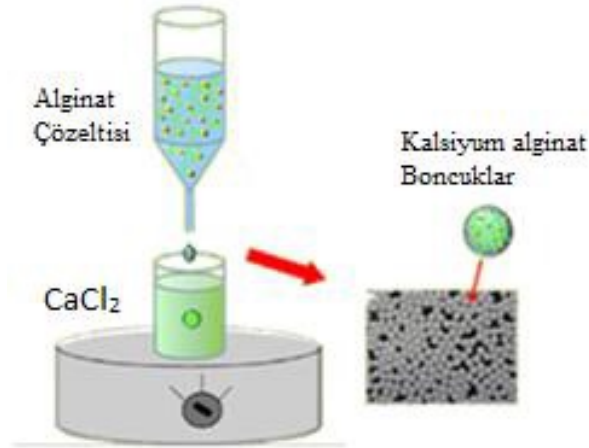
Alginat- propolis kapsüller Keskin' in (2018) bildirdiği metoda göre elde edildi. Bu amaçla %1'lik alginat çözeltisi hazırlandı. 0,1 g sodyum alginat %30'luk (v/v) etil alkol içerisinde çözüldü. 2 mL etanolik propolis ekstraktı, elde edilen alginat çözeltisi içerisine homojen bir şekilde karıştırıldı. Elde edilen homojen karışım bir şırınga yardımıyla 0,05 M CaCl₂ çözeltisi üzerine damlatıldı. Oluşan boncuklar sertleşmenin tamamlanabilmesi için 15 dakika boyunca sabit hız altında karıştırılmaya devam edildi. Elde edilen kapsüller süzüldü, vakum etüvünde 60°C'de kurutuldu. Şematik olarak kalsiyum alginat kapsüllerin eldesi Şekil 2'de gösterilmektedir. Enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

% Enkapsülasyon etkinliği = (A-B)/A*100

A: Propolis ekstraktı toplam polifenol miktarı, mg GAE

B: Kapsülasyon sonrası süzüntü toplam polifenol miktarı, mg GAE



Şekil 2. CaCl₂ varlığında alginat kapsüllerin eldesi

Figure 2. Production of alginate capsules (Keskin, 2018)

In vitro Salınım

Mide ortamı *in vitro* olarak pH 1,50 HCl/KCl çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Bağırsak ortamı ise *in vitro* olarak pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde %1'lik Tween 20 çözeltisi karıştırılarak hazırlandı. *In vitro* salınım oranlarını belirlemek amacıyla, 37°C'ye getirilmiş ve ağız kapalı durumdaki ayrı ayrı erlenler içerisinde karışan 30 mL ortam (mide, ince bağırsak) içerisinde ham propolis ve alginat-propolis kapsül örneklerinden 0,1500'er g eklendi. Her 30 dakikada bir ortamdan 2 mL çözelti alınarak santrifüj edildi. Her seferinde alınan çözelti kadar erlenlere kullanılan ortam çözeltisinden eklendi. Bu işlem 2 saat boyunca tekrarlandı. Elde edilen süpernatantlarda toplam polifenol analizi yapıldı ve salınım miktarı % olarak hesaplandı (Korkmaz ve ark., 2016; Slinkard ve ark., 1977; Singleton ve Rossi, 1965).

Toplam Polifenol Tayini

Her bir adımda örneklerin toplam polifenol miktarı Folin-Ciocalteu metodu ile belirlendi. Bu metot örneklerdeki fenolik bileşiklerin folin reaktifini mavi renkli bir komplekse indirgemesi esasına

dayanmaktadır. İndirgenmiş kompleks 760 nm de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Fenolik standart olarak gallik asit kullanıldı (Singleton ve Rossi, 1965; Slinkard ve ark., 1977). Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi.

İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen sonuçlar üç tekrarın ortalama değerleri olarak hesaplandı. Hesaplamalar Microsoft Office Excel (2013) kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Keskin (2018)'e göre elde edilen kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği, propolis ekstraktı ve kapsülasyon sonrası kalan süzüntüde toplam polifenol tayini yapılarak belirlendi. Buna göre elde edilen alginat-propolis kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği %97,3 olarak hesaplandı. Elde edilen kapsüller Şekil 3.'de gösterilmektedir.



Şekil 3. Alginat- propolis kapsüller

Figure 3. Alginate- propolis beads

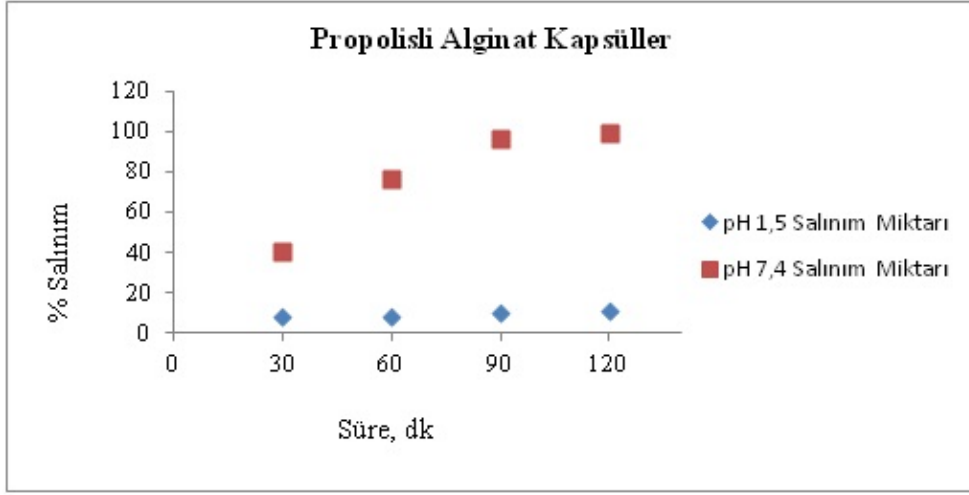
Elde edilen kapsüllerin sindirim sistemindeki davranışı, yapay mide ve ince bağırsak sıvısı kullanılarak belirlendi. Elde edilen bulgulara göre ham propolisin sindirim sisteminde ki salınımı beklenildiği gibi oldukça düşük olarak belirlendi. Alginat-propolis kapsüllerin ise 2 saat sonunda yapay ince bağırsak sıvısı içerisinde tamamen dağıldığı ve içerdiği aktif bileşenleri tamamen saldığı tespit edildi (Şekil 4). Hem ham propolis hem de alginat-propolis kapsüllerin yapay mide sıvısı içerisinde oldukça düşük salınımına sahip olduğu belirlendi. Alginat-propolis kapsüller ve ham propolisin salınım bulguları sırası ile Şekil 5 ve Şekil 6'de gösterilmektedir.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



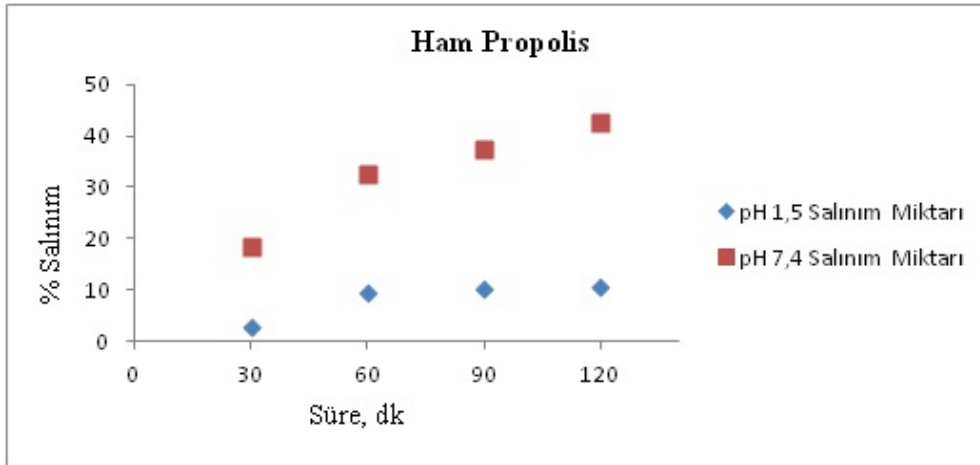
Şekil 4. Alginat-propolis kapsüllerin çözelti içerisinde dağılımı

Figure 4. Solubility of alginat-propolis beads



Şekil 5. Alginat- propolis salınım özellikleri

Figure 5. Alginate-propolis release properties



Şekil 6. Ham propolis salınım özellikleri

Figure 6. Raw propolis release properties

TARTIŞMA

Enkapsülasyon tekniklerinin proses ve depolama kararlılığı, doz kontrolü, oksidasyondan koruma vb. bir çok avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda gıda sektöründe özellikle fonksiyonel gıdaların üretilmesi sürecinde enkapsülasyon teknikleri kullanılarak yeni ürünlerin elde edilmesi artan bir ivme kazanmıştır. Gıda endüstrisinde özellikle biyo veya biyouyumlu polimerlerin kullanımı oldukça yaygındır. Doğal bir koruyucu olan propolisin gıda alanında kullanımı oldukça sınırlıdır. Bu durum propolisin reçinemi yapısı, kendine has ağır bir koku ve aromaya sahip olmasının doğal bir sonucudur.

Propolisin gıda endüstrisinde kullanımını kısıtlayan önemli bir diğer parametre ise onun en iyi etilalkolde çözünbilmesidir. Propolis sağlık alanında da önemli bir paya sahiptir. Arı ürünleri ile tedavi son yıllarda dünya genelinde yükselen bir ivme kazanmıştır. Bu ürünlerden beklenen faydanın sağlanabilmesi içerdikleri aktif bileşenlerin hedeflenen organa yeterli miktarda ulaştırılabilmesi ile mümkündür. Enkapsülasyon ile aktif bileşenler sindirim sisteminin istenilen bölgesine hedeflenebilmekte ve doğru yerde tam olarak salınımları mümkün kılınabilmektedir.

Propolis reçinemi yapısından dolayı en iyi alkolde çözüldüğünden, bu çalışmada etanol fazına alınan biyoaktif bileşenlerinin kapsülasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen kapsüllerin etüvde kurutulması ile alkolü giderilmiş tüketilebilir propolis-alginat kapsüller elde edildi. Bu kapsüllerin sindirim sistemindeki davranışları incelenerek ham propolis kullanılarak elde edilen verilerle ve literatürle kıyaslandı. Literatür incelendiğinde farklı enkapsülantlar kullanılarak propolis aktif bileşenlerinin enkapsüle edildiği birçok çalışma olmakla birlikte bu kapsüllerin sindirim sistemindeki davranışları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu belirlenmiştir.

Literatür incelendiğinde, farklı biyopolimerler kullanılarak elde edilen kapsüllerin ve jellerin salınım oranlarının birbirinden oldukça farklı olduğu görülmüştür. Juliano ve ark., (2007) alginat kullanarak elde edilen kapsüllerin, polifenollerini yavaşça salıdığı ve 2 saat sonunda %96,3 oranında salınım olduğunu ifade etmektedir. Literatürde iyonik jelyasyon tekniği ve alginat kullanılarak elde edilen propolisli kapsüller ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır.

Fakat polimer ve tekniklerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Duran ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, poli-ε kaprolakton kullanarak propolis aktif bileşenlerinin kapsüllenmiş ve elde edilen kapsüllerin belirlenen koşullarda aktif bileşenlerin ortalama %60'ını salıdığı bildirilmiştir. Kalogeropoulos ve ark., (2009) β-siklodekstrin kullanarak etanolik propolis ekstraktını kapsüllemişlerdir. Salınım yüzdesinin 2 saat sonunda ortalama %40 civarında olduğu belirtilmiştir. Liu ve ark., (2007) dış macunu yapımında kullandığı propolis yüklü kitosan nanokapsüllerin salınımı incelemiştir. Elde edilen nanokapsüllerin 10 saatin sonunda %88 oranında salınım yaptığı tespit edilmiştir. Enkapsülasyon için kullanılan polimerin ve yöntemin kapsülleme etkinliği üzerine etkisi olduğu gibi salınım özellikleri üzerine de etkisi vardır. Gerek bu çalışmada elde edilen veriler gerekse literatür çalışmaları bu durumu desteklemektedir.

SONUÇ

Bu çalışma ile elde edilen alkolü giderilmiş propolis yüklü alginat kapsüllerin hedef noktada yüksek oranda salınım yaptığını göstermektedir. Ham olarak tüketilen propolisin reçinemi yapısından dolayı salınımının ve sindirim oranının düşük olduğu, alkol bağımsız tüketilebilir kapsüllerin bağırsak ortamında neredeyse tamamen aktif bileşenleri salıdığı ve ham propolise göre iki kat daha fazla aktif bileşenleri hedef noktaya ulaştırabileceği de gözlenmiştir. Geleneksel ve tamamlayıcı tıpın ve apiterapinin hızla önem kazanmasıyla ilaç etkisi gösterecek olan doğal ürünlerin hedef noktaya varışı ve beklenen etkiyi göstermesi açısından enkapsülasyon teknikleri önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda, propolisin apiterapi amaçlı kullanımını ve etkinliğini artıracığı ifade edilebilir.

KAYNAKLAR

- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. ve Nakayama, T. (2007). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China, *Food Chemistry*, 101,1383-1392.
- Aliyazicioglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. ve Kolayli, S. (2013). Properties of phenolic composition and biological activity of propolis

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- from Turkey, *International Journal of Food Properties*, 16, 277-287.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S. ve Martino, M. N. (2008). Encapsulation of Natural Antioxidants Extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydrate Polymers*, 71, 126–134.
- Duran, N., Marcato, P.D., Buffo, C.M.S., De Azevedo, M.M. M. ve Esposito, E. (2007). Poly (ϵ -caprolactone)/Propolis Extract: Microencapsulation and Antibacterial Activity Evaluation, *Pharmazie*, 62, 287-290.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. ve Saurel, R., (2007). Applications of Spray-drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview, *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Juliano, C., Pala, C.L. ve Cossu, M. (2007). Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17 (1).
- Kalogeropoulos; N., Konteles, S., Mourtzinis, I., Troullidou, E., Chiou, A. ve Karathanos, V. T., 2009. Encapsulation of Complex Extracts in β -cyclodextrin: An Application to Propolis Ethanol Extract, *Journal of Microencapsulation*, 26, 7, 603-613.
- Keskin, M. (2018). Propolis ve özütlerinin kalite parametrelerinin belirlenmesi ve enkapsülasyonu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Korkmaz, O., Girgin, B., Sunna, Ç., Yavaşer, R. ve Karagozler, A. A., (2016). Production and Investigation of Controlled Drug Release Properties of Tamoxifen Loaded Alginate-Gum Arabic Microbeads, *JOTCSA*, 3, 3, 47-58.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. ve Kadota, S. (2008). Cytotoxic Constituents From Brazilian Red Propolis and Their Structure–Activity Relationship, *Bioorg., Med., Chem.*, 16, 5434–5440.
- Liu, H., Chen, B., Mao, Z. ve Gao, C. (2007). Chitosan Nanoparticles for Loading of Toothpaste Actives and Adhesion on Tooth Analogs, *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 4248–4256.
- Nedovic, V., Kalusevica, A., Manojlovic, V., Levica, S. ve Bugarski, B. (2011). An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications, *Procedia Food Science*, 1, 1806 – 1815.
- Pasupuleti, V., R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S.H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits, *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1259510.
- Singleton V. L. ve Rossi J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic–Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Slinkard, K ve Singleton, V.L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.