



# Çam Balı Takviyeli Kitosan Esaslı Aktif Filmler

## *Honey Incorporated Chitosan Based Active Films*

Özge Kuyucak<sup>1</sup> , Pınar Terzioğlu<sup>1\*</sup> , Yusuf Sıcak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Polimer Malzeme Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>2</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Köyceğiz Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Muğla, Türkiye

### Öz

Yara örtüleri, özellikle kronik iyileşmeyen yaraların iyileşmesini hızlandırmada ve enfeksiyonu önlemede önemli rol oynamaktadır. Bal, biyouyumlu ve biyoaktiviteye sahip olduğu için modern klinik yara bakımı uygulamalarında değerlendirilmektedir. Son yıllarda, bal içeren polimer esaslı malzemelerin yara iyileşme sürecini destekleyen terapötik özelliğe sahip ideal adaylar olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, çözelti döküm yöntemi kullanılarak çam balı (% 0-12,5) içeren kitosan esaslı filmler geliştirildi. Filmlerin morfolojisi ve yapısal özellikleri sırasıyla taramalı elektron mikroskobu ve Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile belirlendi. Filmlerin antioksidan aktivitesi dört farklı metot ile değerlendirildi. FT-IR spektrumları çam balının kitosan filmlere başarıyla dâhil edildiğini gösterdi. Bal ilavesi filmlerin antioksidan aktivitesini artırdı. Bu sonuçlar, çam balı içeren kitosan filmlerin yaraları tedavi etmek için faydalı etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Bu filmler, ek testler ve spesifik klinik deneylerden sonra çeşitli yara türlerinde kullanılan potansiyel iyileştirici ajan olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bal, Kitosan film, Biyoaktivite

### Abstract

Wound dressings play an important role in accelerating the healing of chronic non-healing wounds and preventing infection. Honey is evaluated in modern clinical wound care applications due to having biocompatible and bioactivity. In recent years, it is thought that honey / polymer hybrid materials can be ideal candidates with therapeutic properties that support the wound healing process. In this study, chitosan based films containing pine honey (0-12.5%) were developed by solution casting method. The morphology and structural properties of the films were determined by scanning electron microscopy and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), respectively. The antioxidant activity of the films was determined by four different methods. The FT-IR spectra showed that pine honey was successfully incorporated into chitosan films. The addition of honey increased the antioxidant activity of the films. These results show that chitosan films containing pine honey would have beneficial effects to treat wounds. These films may be potential healing agents used in various types of wounds after additional tests and specific clinical trials.

**Keywords:** Honey, Chitosan film, Bioactivity

### 1. Giriş

Genel olarak, doku bütünlüğünün bozulması sonucunda ciltteki hasara yara denilmektedir. Yara tedavisi eski zamanlardan beri güncelliğini koruyan konulardan biridir (Güneş ve Eşer 2006). Yara iyileşmesi, doku rejenerasyonunun farklı

ve karmaşık biyokimyasal ve hücrel mekanizmalar ile gerçekleşmesidir. Yara örtüleri, yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılan medikal malzemelerdir. Geleneksel yara örtüleri (yara bandı, sargı bezi ve gazlı bez vb.) ile bakteri girişi önlenerek kuru ortamda yara iyileşmesi sağlanmaya çalışılmaktadır (Sasikala vd. 2018). Günümüzde ise bu yaklaşım neredeyse tamamen değişmiş ve yara iyileşmesinin belli oranda nemli ortamda daha iyi gerçekleştiği belirlenmiştir (Sasikala vd. 2018). İdeal bir yara örtüsünün sahip olması gereken özellikler sıralanacak olursa, nemli bir yara iyileştirme ortamı oluşturmalı, aşırı eksüdayı emmeli, gaz değişimine izin vermeli ve yarada travmaya sebep olmaksızın kolayca çıkarılabilmelidir (Wang vd. 2012). Ayrıca, yara örtüsü an-

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: [pinar.terzioğlu@btu.edu.tr](mailto:pinar.terzioğlu@btu.edu.tr)

Özge Kuyucak [orcid.org/0000-0003-1999-1791](https://orcid.org/0000-0003-1999-1791)  
Pınar Terzioğlu [orcid.org/0000-0003-4114-7044](https://orcid.org/0000-0003-4114-7044)  
Yusuf Sıcak [orcid.org/0000-0003-2339-5837](https://orcid.org/0000-0003-2339-5837)



tibakteriyel, biyoyumlu ve toksik olmayan özellikte olmalıdır (Stashak vd. 2004). Geleneksel yara örtülerine alternatif olarak yara iyileşme sürecini desteklemek için biyoaktif bileşen veya ilaç içeren modern yara örtüleri geliştirilmektedir (Abou-Okeil vd. 2018, López-Iglesias vd. 2019, Kheradvar vd. 2018). Bunun bir diğer sebebi de farklı yara çeşitlerine cevap verebilecek uygun malzemelerin üretilmesidir.

Son yıllarda, biyoyumlu polimerlerin yara iyileşmesindeki avantajlarının fark edilmesi ile bu polimerlerin etkili yara örtüsü geliştirilmesinde değerlendirilmesine yönelik pek çok araştırma yapılmaktadır. Kitosan, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir biyopolimerdir. Doğal bir polisakarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen kitosan, amino gruplarına sahip ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir (Shepherd vd. 1997). Kitosan, biyomalzemeler için istenen özellikler olan hemostaz, biyoyumluluk ve biyobozunurluk gibi önemli özelliklere sahiptir (Fan vd. 2009). Bakteri, mantar ve maya gibi farklı mikroorganizma gruplarına karşı antimikrobiyal etkiye sahip olması ve diğer birçok fonksiyonel özellikleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Dolayısıyla, yara tedavisi için ideal bir malzeme olduğu belirtilmiştir (Wang vd. 2012). Genellikle, hidrojel film şeklinde üretilerek yara bakım uygulamaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Boucard vd. 2007, Ribeiro vd. 2009).

Yüzyıllardan beri bal, insanoglu için önemli besin kaynağı olarak tüketilmiştir. Geleneksel olarak bal, yara tedavisinde eski zamanlardan beri kullanılan bir doğal üründür. Balın biyoaktivitesi çapraz kontaminasyonu önler, nemli bir yara iyileşme ortamı sağlar, kötü kokuyu giderir, yara iyileşmesini destekleyen antibakteriyel ve antiinflamatuvar etki mekanizmasını uyarır (Sasikala vd. 2018, Dunford vd. 2000).

Bal ayrıca bir antioksidan olarak da rol oynamaktadır. Balın bileşimi biyolojik aktivitesinde önemli rol oynar (Wahyuningtyas vd. 2018). Balda 200 çeşit civarında bileşen vardır. Bal yapısında bulunan aminoasitler, flavonoidler, fenolik asitler, enzimler mineraller, organik asitler ve vitaminler gibi fonksiyonel bileşenler sayesinde besleyici ve birçok hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici özelliğe sahip karbonhidrat açısından zengin bir gıdadır (Mutlu vd. 2017, Zhang vd. 2022). Balın bileşimi ise büyük ölçüde kaynağına ve üretildiği coğrafyaya bağlıdır (Wang vd. 2012). Türkiye, Dünya çam (salgı) balı üretiminin yaklaşık %92'sine sahip ve çam balı ihracatında dünyada birinci sıradadır. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre balın sahip olması gereken özellikler Çizelge 1'de sunulmaktadır. Coskun ve Karabulut-Dırıcın (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Muğla çam balının fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde, pH, asitlik (meq/kg), brix (%), invert şeker (g/kg), sakaroz (g/kg), toplam şeker (g/kg) değerleri sırasıyla 4.81, 22, 26, 521.47, 121.28 ve 642.95 olarak bulunmuştur (Coskun ve Karabulut-Dırıcın 2019). Ayrıca, Muğla çam ballarının diastaz sayısının ~ 7-22, toplam fenolik madde miktarının 234 - 394 mg/100 g arasında değiştiği ve molibden, bor, kalsiyum, demir, potasyum, magnezyum, mangan, sodyum, fosfor ve çinko gibi önemli mineralleri içerdiği belirlenmiştir (Akbulut vd. 2009).

Bal sıvı olduğu için direkt olarak yaralı bölgeye uygulandığında cilt sıcaklığında daha akışkan hale gelmesi nedeniyle vücudun her bölgesinde kullanımı kısıtlanmaktadır. Buna ilaveten, sıvılaştıran balın sızması gerekli terapötik konsantrasyonun yeterli bir süre boyunca korunmasında zorluklara yol açmaktadır (El-Kased vd. 2017). Bu olumsuzluklar balın uygun bir polimerin matrisine ilavesi ile ortadan kaldırılmaktadır.

**Çizelge 1.** Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne (2020/7) göre balın sahip olması gereken özellikler

Özellik (100 g balda)	Salgı balı	Çiçek balı
Nem (en fazla, %)	20	20
Sakkaroz (en fazla, g)	5	5
Fruktoz + glikoz (en az, g)	45	60
Maltoz (en fazla, %)	4	4
Diastaz sayısı (en az)	8	8
Prolin miktarı (en az, mg/kg)	300	300 Çiçek balının türüne göre değişmektedir.
Balda protein ve ham bal $\delta^{13}C$ değerlerinden hesaplanan C4 şekerleri oranı (en fazla, %)	7 Çam balında bu kriter aranmaz	7

Bal, yara iyileşmesi için uygunluğundan dolayı ticari olarak mevcut yara örtülerinde kullanılmaktadır (Yusuf vd. 2007). Yeni Zelanda'ya özgü bir bal olan Manuka (*Leptospermum scoparium*) ve çiçek balı kullanılarak polimer esaslı yara örtü malzemeleri geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur (Wang vd. 2012, Arslan vd. 2014). Manuka balı içeren aljinat yara örtüleri Activon – Manuka Honey dressings ve MANUKAhd® ticari ürünleri olarak piyasada bulunmaktadır.

Son yıllarda, Türkiye'de üretilen balları içeren nanolif esaslı yara örtülerinin geliştirilmesi ile ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, çiçek balı/polietilen tereftalat/kitosan (Arslan vd. 2014), çam balı/polivinil alkol/jelatin (Parin vd. 2021a) ve çam balı/borik asit/poliamid 6 (Parin vd. 2021b) esaslı geliştirilen malzemeler uygun yapısal özellikleri nedeniyle potansiyel yara örtüsü malzemeleri olarak önerilmiştir. Fakat literatürde çam balı katkılı polimer film esaslı medikal malzeme geliştirilmesine yönelik herhangi bir bilimsel makale mevcut değildir. Bu çalışmada, çam balı içeren kitosan esaslı filmler çözelti döküm yöntemi ile geliştirildi. Farklı oranlarda bal içeren kitosan esaslı filmlerin yapısal, morfolojik, şişme ve antioksidan aktivite özellikleri incelendi.

## 2. Gereç ve Yöntemler

### 2.1. Malzemeler

Filmlerin hazırlanmasında, kitosan (deasetilasyon derecesi  $\geq 75\%$ , Sigma-Aldrich), asetik asit (%100, Isolab), gliserol (%85, Isolab) ve Muğla çam balı (Balıcı Gökmen) kullanıldı. Balın özellikleri; nem %15, pH 4,20, prolin değeri 489 mg/kg ve diastaz aktivitesi 11'dir.

### 2.2. Balın LC-TOF-MS Analizi

Çam balının kimyasal içeriği, TOF (6210 Time of Flight) dedektörü ile birleştirilmiş 1260 Infinity HPLC Sistemi (Agilent Technologies) cihazı ile belirlendi. Bal numunesi enjeksiyon öncesinde PTFE filtreden (0.45  $\mu\text{m}$ ) geçirildi. Bileşikler ayırmak için Poroshell 120 EC-C18 (27 mm, 4.0x50 m, Agilent Technologies) kullanıldı. Kolon sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 35°C, 0.6 mL/dk ve 5  $\mu\text{L}$  olacak şekilde analiz gerçekleştirildi. TOF analizi negatif iyon modunda analiz edildi. Analiz gaz sıcaklığı, 325°C; kurutma gazı akışı, 10 mL/dk; fragman voltajı, 175 V' da gerçekleştirildi. Mobil faz, su (A) ve asetonitril (B) içinde %0.1 formik asetik asitten oluşmaktadır. Gradyan 0-1 dakikada %10 B, 1-20 dakikada %50 B, 20-23 dakikada %80 B, 23-25 dakikada %10 B, 25-30 dakikada %10 B.

**Çizelge 2.** HPLC-TOF/MS yöntemi ve tanımlama için kullanılan standartların alıkonma süreleri ve MS/MS parametreleri

Analit	m/z <sup>a</sup> [M-H] <sup>-</sup>	Alıkonma süresi
Fumarik asit	115.0130	3,17
Gentisik asit	153.0297	4,50
Klorojenik asit	353.1060	5,48
Protokateşik asit	153.0296	7,10
Sirinjik asit	197.0580	8,08
Salisilik asit	137.0344	13,11

<sup>a</sup> İyon (m/z) [M-H]<sup>-</sup>: Standart bileşiklerin moleküler iyonları (kütle-yük oranı)

### 2.3. Filmlerin Hazırlanması

Kitosan çözeltisi (ağırlıkça %2), kitosanın seyreltik asetik asit çözeltisinde (%1 v/v) manyetik karıştırıcıda 50°C'de homojen çözelti elde edilinceye kadar karıştırılarak hazırlandı. Sonra çözeltiye sodyum bikarbonat çözeltisi (% 5, 5 mL) damla damla ekledi. Başka bir tarafta bal distile su (20 mL) ile iyice çözümlenerek seyreltildi. Seyreltilen bal (0-12,5 g) kitosan çözeltisine eklenerek yarım saat boyunca 40°C'de karıştırıldı. Son aşamada çözeltiye gliserol (0.5 mL) eklendi ve bir gece boyunca karıştırıldı. Film çözeltisi teflon kalıplara (18 cm) dökülerek 40°C'de 48 saat kurutuldu. Çizelge 2'de verilen 5 farklı kompozisyona sahip film üretimi gerçekleştirildi. Numuneler 0/ 2,5/ 5/ 7,5/10 ve 12,5 g bal içeriğine göre sırasıyla KB0, KB1, KB2, KB3, KB4 ve KB5 şeklinde isimlendirildi.

### 2.4. Filmlerin Karakterizasyonu

Filmlerin yapısında bulunan fonksiyonel grupların karakterizasyonu FT-IR spektrofotometresi (NICOLET - IS50) ile 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında ve 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte gerçekleştirildi.

Filmlerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (Carl Zeiss Gemini 300, Almanya) kullanılarak gözlemlendi. Vakum buharlaştırıcı ile numuneler altın ve paladyum ile kaplandı.

Filmlerin suda şişme özelliklerini belirlemek için numuneler 2x2 cm ebatlarında kesilerek etüvde 37°C'de 24 saat kurutulduktan sonra tartıldı ( $W_0$ ). Daha sonra numuneler 25°C'de distile suya daldırılarak 24 saat sonra tartıldı ( $W_{\text{şişen}}$ ). Filmlerin distile su içindeki şişme değerleri denklem 1 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Şişme} = \frac{W_{\text{şişen}} - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

Filmlerin antioksidan aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (6.25, 12.5, 25 ve 50 µg/mL) yapıldı. Antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılmasında pozitif standart olarak alfa-tokoferol (α-TOC) ve bütil hidroksi toluen (BHT) kullanıldı.

Filmlerin, toplam antioksidan aktivite tayini β-karoten-linoleik asit renk açılımını ifade eden linoleik asitin oksidasyona uğramasıyla konjuge dien hidroperoksitlerinin ölçülmesine dayanan yöntem kullanılarak tespit edildi (Marco 1968, Öztürk vd. 2007). DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal süpürücü aktivite tayini için Blois (1958) tarafından geliştirilen metot kullanıldı. ABTS katyon radikali giderim aktiviteleri ve Cu (II) indirgeme gücü sırasıyla Re vd. (1999) ve Apak vd.(2004) metotlarına göre tespit edildi.

### 3. Bulgular

#### 3.1. Filmlerin Yapısal Özellikleri

Çam balına ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 1) bala ait karakteristik pikler tespit edildi. Bala ait spektrumda, 3266 cm<sup>-1</sup>'de -OH gerilme titreşimi ve C-H gerilme, 1640 cm<sup>-1</sup>'de C=O gerilme ve amit I'in N-H bükülme, 1026 cm<sup>-1</sup>'de C-O ve C-C gerilme, 900-700 cm<sup>-1</sup>'de C-H eğilme titreşimi görüldü (Parin vd. 2021a, Gok vd. 2015).

Kompozit filmleri oluşturan kitosan ve bal arasındaki etkileşimleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen FT-IR analizi sonucu elde edilen spektrumlar Şekil 2'de gösterilmektedir. Kitosan esaslı filme (KB-0) ait spektrumda, C-N (1151 cm<sup>-1</sup>), C-O bağı gerilme titreşimi (1257 ve 1324 cm<sup>-1</sup>), C-H eğilme (1403 cm<sup>-1</sup>), amino grubu (NH<sup>3+</sup>, 1548 cm<sup>-1</sup>), C=O gerilme (amit I, 1648 cm<sup>-1</sup>) ve C-H gerilme titreşimi (2934 ve 2873 cm<sup>-1</sup>) karakteristik pikleri olduğu tespit edildi. Benzer sonuçlara literatür çalışmalarında da rastlanmıştır (Mazloom-Jalali vd. 2020, Priyadarshi vd. 2018, Siripatrawan ve Vitchayakitti 2016, Gómez-Chabala 2017). 1110-1040 cm<sup>-1</sup> aralığındaki bant, kitosan halka yapısındaki CO gerilmesine karşılık gelmektedir (Priyadarshi vd. 2018). Ayrıca, 3200-3400 cm<sup>-1</sup> bant aralığında birincil amin (-NH) gerilme ve -OH gerilme titreşimleri görülmektedir (Gómez-Chabala 2017, Escárcega-Galaz 2018).

Bal içeren kompozit filmlere ait spektrumlar kitosan esaslı kontrol filmine ait spektrum ile karşılaştırıldığında bazı yeni pikler oluşurken bazı piklerin kaybolduğu tespit edildi. Bal içeren filmlerde (KB1-KB5) 817 cm<sup>-1</sup> ve 776

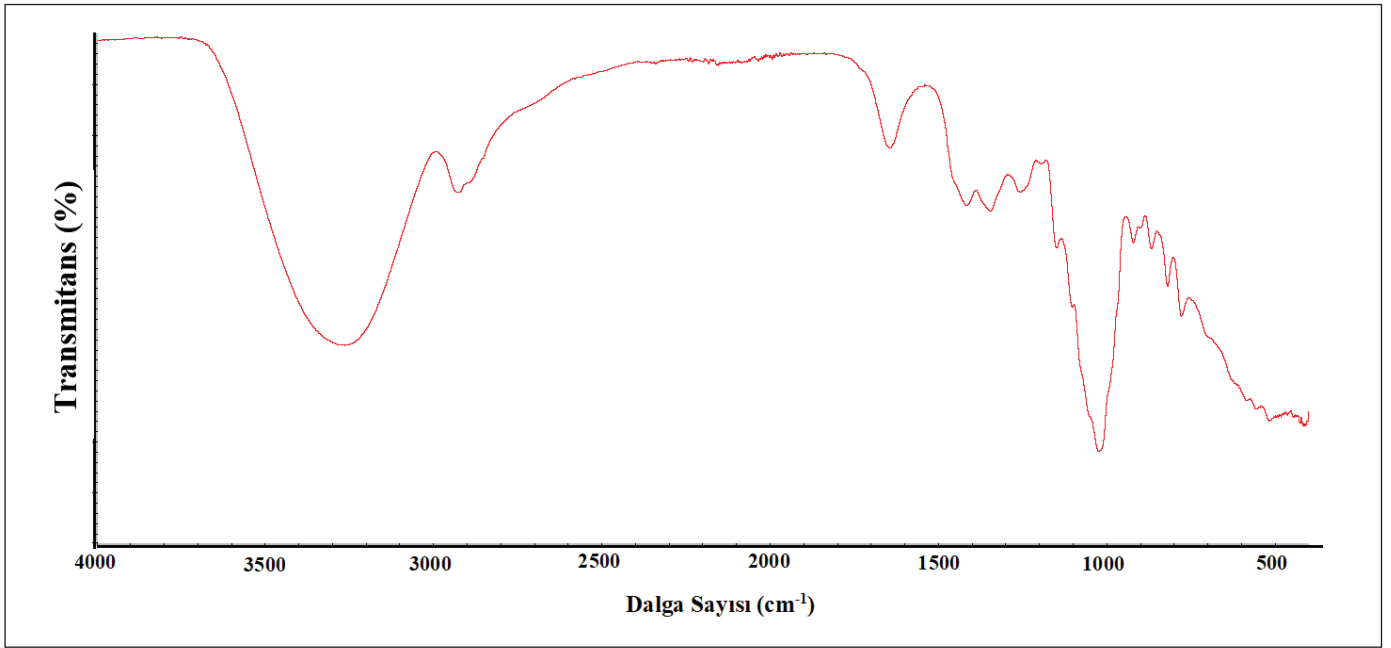
cm<sup>-1</sup>'de karbonhidratlardaki C-O ve C-C gerilmesi (Pataca vd. 2007, Nguyen vd. 2019) ve C-H eğilme titreşiminin sakkarit konfigürasyonlarını temsil eden (Nguyen vd. 2019, Gok vd. 2015) yeni küçük pikler meydana geldiği belirlendi. Ayrıca, kontrol filmde 648, 620 ve 556 cm<sup>-1</sup>'de yer alan piklerin kompozit filmlerde kaybolduğu tespit edildi. Bu değişimlere ilaveten 1648 cm<sup>-1</sup>'deki pikin hafifçe daha küçük dalga boyuna (~1643 cm<sup>-1</sup>) kaydığı görüldü. 1548 cm<sup>-1</sup>'deki pikin ve 1403 cm<sup>-1</sup>'deki pikin daha yüksek dalga boyuna (1562 ve 1409 cm<sup>-1</sup>, sırasıyla) kaydığı ve pik yoğunluklarının azaldığı belirlendi. Bu iki pik yoğunluğundaki azalışın genel olarak artan bal miktarı ile artması, yüksek miktarda bal ilavesi ile bal-polimer etkileşimlerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Tüm bu değişimler balın polimer matrisine başarılı bir şekilde dâhil olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar potansiyel biyoaktif yara örtüsü olarak kullanılmak üzere geliştirilen Akasya balı içeren Aljinat/Polivinil alkol esaslı nanolif esaslı malzemelerde de tespit edilmiştir (Tang vd. 2019).

#### 3.2. Filmlerin Şişme Davranışı

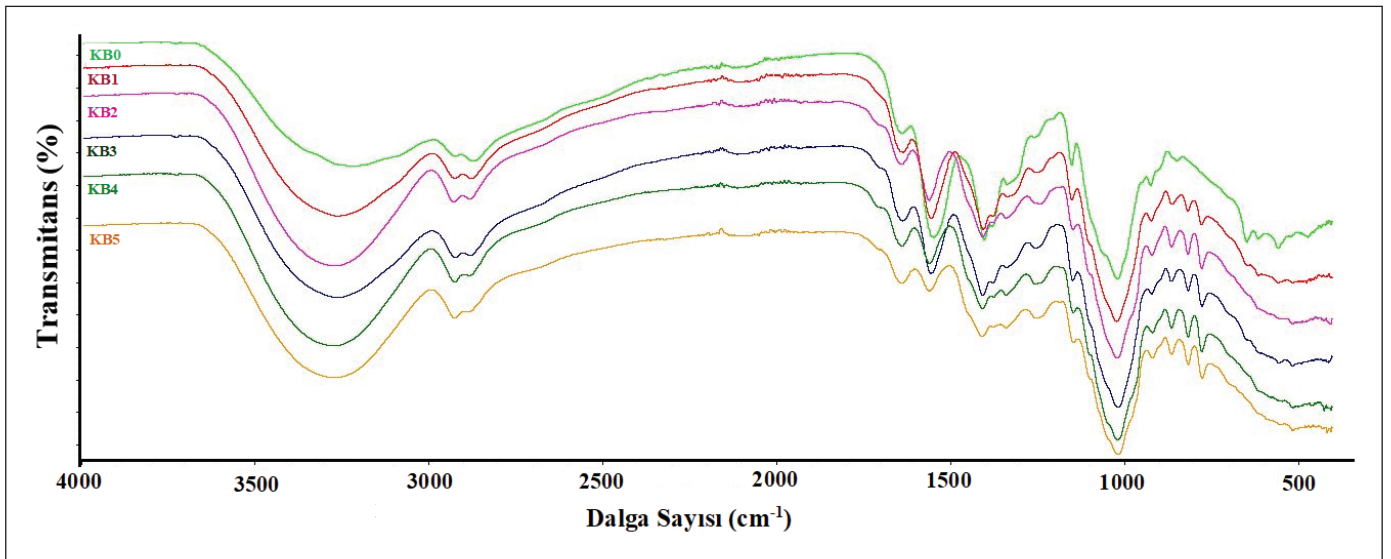
Şişme kapasitesi, özellikle eksüdasyon yaralarında yara örtülerinin önemli bir özelliğidir. Yüksek sıvı tutma kapasitene sahip yara örtüleri şişerek orta dereceli yara eksüdarını emebilirler. Bu da iyileşme sürecine yardımcı olan yarı kuru bir yara yatağının oluşmasına yol açar (El-Kased vd. 2017).

Kitosanın su tutması yapısında bulunan hidrofilik gruplar (hidroksil ve amino grupları) ile ilgilidir (Kamel vd. 2017). Kompozit bir filmde ise numune matrisinin hidrofilitesi ve su tutmaya eğilimi ile birlikte matris bileşenlerinin çapraz bağlanma derecesi gibi pek çok parametre malzemenin şişme davranışına etki etmektedir (Khaleghi vd. 2018). Sadece kitosan esaslı filmin yapısına farklı oranlarda bal katıldığında filmlerin şişme davranışında düşme meydana geldi. Plastikleştirici olarak kullanılan gliserol ile kitosanın etkileşimi sonucunda yüksek şişme değeri elde edilirken, matrikse balın eklenmesi sonucunda plastikleştirici ile polimerin etkileşimi azaldığı için şişme oranında azalma meydana gelmektedir (Sasikala vd. 2018). Ayrıca bal-polimer etkileşiminden dolayı daha sıkı bir yapının oluşması sonucunda şişme oranlarında düşme meydana geldi. Bu etkileşimler, kitosan zincirlerinin hareketliliğini kısıtlayarak suyun difüzyonunu azaltmıştır (Kamel vd. 2017). Filmlerin artan bal miktarına bağlı olarak artan oranda şişme davranışı gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). Bu durum balın hidrofilik yapısından kaynaklanmaktadır (Sasikala vd. 2018). Artan oranda hidrofilik gruplar ile su molekülleri arasında hidrojen bağı





Şekil 1. Balın FT-IR spektrumu.



Şekil 2. Filmlerin FT-IR spektrumu.

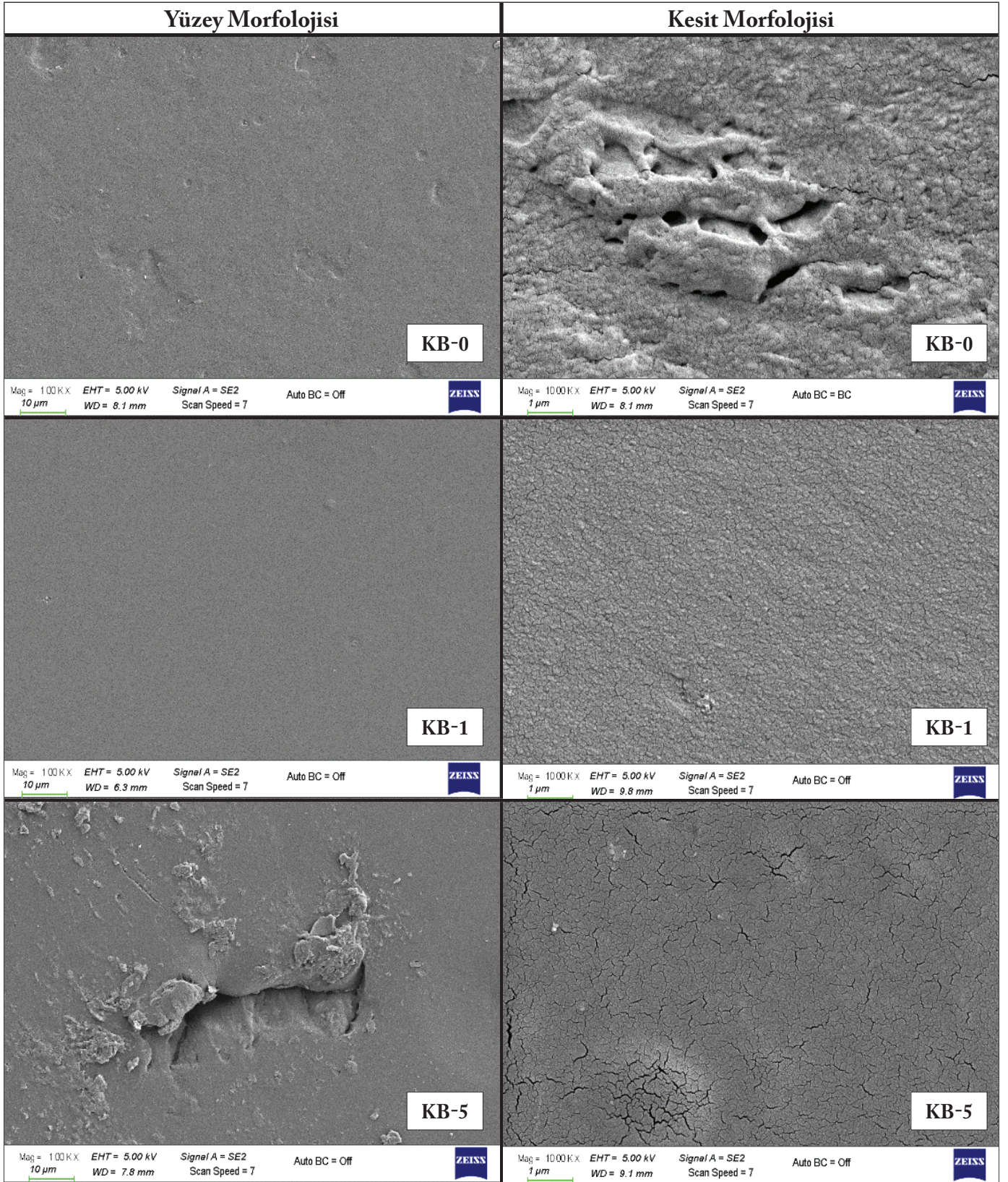
oluşturmuştur. Bu çalışmada hazırlanan KB-5 filmi, nemli bir iyileşme ortamına ihtiyaç duyan nekrotik ve kabuklu yara gibi düşük derecede eksüdal yaralarının tedavisi için değerlendirilebilir (Afshari, vd. 2015). Bu filmler sıvı ile doyduklarında değiştirilmelidir.

### 3.3. Filmlerin Morfolojisi

Filmlerin yüzey ve kesit morfolojisi Şekil 3'de verilmektedir. Yüzey morfolojileri incelendiğinde sadece kitosan esaslı olan filmin yüzeyinin hemen hemen homojen bir görüntüye

sahip olduğu ve KB-1 örneğinde yüzey homojenliğinin arttığı belirlendi. En yüksek oranda bal içeren KB-5 örneğinin yüzeyinin heterojen olduğu ve çatlak oluştuğu gözlemlendi. Filmlerin kesit morfolojisinin birbirinden farklı olduğu belirlendi. Sadece kitosan esaslı filmde gözenekler gözlemlendi. Bal ilavesi ile ara yüzey uyumluluğunun arttığı belirlendi. KB-1 filmi daha pürüzsüz bir kesite sahipken, KB-5 filmi kesiti incelendiğinde küçük çatlakların bulunduğu tespit edildi. Neres-Santos vd. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Polivinil alkol/Jelatin/Manuka Balı esaslı çapraz





Şekil 3. Filmlerin SEM mikrografları.



bağlı jeller geliştirilmiştir. Yapılan SEM incelemesi sonucunda sadece Polivinil alkol/Jelatin esaslı numunelerin kesit yüzeyinde 3 katmanlı yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Bal içeren örneklerde ise muhtemelen balın numune gözeneklerinde yer alması nedeniyle farklı katmanları ayırt etmenin zor olduğu belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalarda bir filmdeki gözeneklerin yeterli gaz geçirgenliği sağladığı, hücre büyümesini iyileştirdiğini ve besin ve atık ürünlerinin değişimini kolaylaştırdığını bildirilmiştir (Bierhalz vd. 2016, Depan vd. 2011).

### 3.4. Filmlerin Antioksidan Aktivitesi

Yara iyileşmesi sırasında antioksidan seviyesinin artması ile yara iyileşme sürecini hızlandırmak için doğal antioksidanlar tercih edilmektedir (Bölgen vd. 2020). Aşırı miktardaki reaktif oksijen türleri ve mikrobiyal enfeksiyon yara iyileşme süreci için ana zorluklardır. Antioksidan ajanlar, hücre içi reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltmakta ve nitrik oksit üretimini zayıflatmaktadır (Bölgen vd. 2020). Bu yüzden antioksidan özelliğe sahip yara örtülerinin geliştirilmesi ve uygulamasına yönelik ilgi her geçen gün artmaktadır. Bal fenolikler, flavonoidler, karotenoidler, proteinler, organik asitler, amino asitler, vitaminler (B1, B2, B3, B9, B12, C) ve Maillard reaksiyon ürünleri gibi zengin biyoaktif bileşenlere sahip olduğu için antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilimsel literatürde yer almaktadır (Sıcak vd. 2021, Vela vd. 2007, Nasuti vd. 2006). Ayrıca, çam balı gibi salgı ballarının pek çok çiçek balından daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Pita-Calvo vd. 2017).

Filmlerin dört farklı metot ile belirlenen antioksidan aktivitelerinin  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) değerleri Çizelge 3'de gösterilmektedir. Bal ilave edilen filmler kontrol filmi ile kıyaslandığında daha iyi aktivite gösterdi. KB-1 filmi,  $\beta$ -karoten-linoleik asit, DPPH serbest radikal giderim, ABTS katyon radikal giderim ve CUPRAC kapasitesi aktivitesinde en aktif film olarak tespit edildi.  $\beta$ -karoten-linoleik asit aktivitesi ve ABTS katyon radikali giderim aktivite test verilerine göre, KB-1 filmi testin standardı olarak kullanılan  $\alpha$ -TOC ve BHT'den daha az aktivite sergilerken DPPH radikali giderim aktivitesi test verilerine göre BHT'den ve CUPRAC aktivitesi test sonuçlarına göre  $\alpha$ -TOC'den çok daha iyi aktivite sergiledi. Tang vd. (2019) tarafından yapılan çalışmanın sonucunda da benzer bulgular ile karşılaşılmıştır. Çalışmada, Aljinat/Polivinil alkol esaslı nanolif esaslı malzemelere akasya balı ilavesi ile DPPH serbest radikal giderim aktivitesinde artış meydana geldiği raporlanmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada, çam balının kimyasal bileşenleri fumarik asit, gentisik asit, klorojenik asit, protokateşik asit, şirinjik asit ve salisilik asit şeklinde sırasıyla 90,1, 136,2, 169,2, 128,5, 135,2 ve 46,3 mg/kg bal olarak belirlendi. Literatür çalışmalarında fumarik asit (Basha vd. 2020), klorojenik asit (Song vd. 2022) ve salisilik asit (Oh vd. 2021), katkılı hidrojellerin yara iyileştirme uygulamaları için umut vadeden malzemeler olabileceği ileri sürülmüştür. Bir diğer çalışmada protokateşik asitin antioksidan, adeziv ve antiinflamatuvar etkisi sayesinde enjekte edilebilir jelatin aşıllı protokateşik asit ve oksitlenmiş dekstran kompozit hidrojelinin cilt yenilenmesi için yara örtüsü olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

**Çizelge 3.** Filmlerin antioksidan aktivite ve şişme davranışı sonuçları

Numune	Film çözeltisi bileşiminde bal miktarı (g)*	Antioksidan Aktivite				Şişme (%)
		$\beta$ -karoten-linoleik asit ( $IC_{50}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	DPPH aktivitesi ( $IC_{50}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ABTS+ aktivitesi ( $IC_{50}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CUPRAC kapasitesi ( $A_{0.5}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
KB-0	0	50,12±0,28	39,27±0,81	41,09±0,67	35,28±0,02	80,2±5,2
KB-1	2,5	34,29±0,40	21,03±0,47	30,34±0,19	20,13±0,00	3,3±1,5
KB-2	5	36,51±0,72	23,64±0,92	32,56±0,12	22,26±0,00	4,7±0,8
KB-3	7,5	39,18±0,33	29,31±0,30	35,07±0,38	27,67±0,00	6,6±0,7
KB-4	10	41,80±0,41	30,09±0,99	39,15±0,85	29,90±0,01	17,3±2,1
KB-5	12,5	43,25±0,61	31,77±0,60	40,01±0,17	33,04±0,01	45,3±3,4
$\alpha$ -TOC	-	4,48±0,14	12,30±0,11	4,91±0,51	40,61±0,01	-
BHT	-	2,39±0,29	54,87±0,42	2,98±0,62	4,03±0,03	-

\*Her bir çözeltide 2 g/100 mL kitosan ve 0,5 mL gliserol bulunmaktadır.

tir (Liang vd. 2022). Bu çalışmalarında balın zengin içeriği sayesinde yara örtüleri için uygun bir katkı maddesi olma potansiyelini desteklediği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçları genel olarak özetlemek gerekirse bu çalışmada, yara iyileşmesine yararlı etkileri ile bilinen çam balının kitosan esaslı filmlere eklenmesinin filmlerin yapısal, fiziksel, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri üzerine etkisi incelendi. Morfoloji çalışmaları bal ilavesi ile ara yüzey uyumluluğunun arttığını gösterdi. FT-IR analizi, kitosanın fonksiyonel grupları ile bal arasında etkileşimin oluştuğunu gösterdi. Bu çalışmada gerçekleştirilen antioksidan aktivite testleri değerlendirildiğinde bal ilaveli tüm filmler sadece kitosan esaslı (kontrol) filminden daha yüksek  $\beta$ -karotenlinoleik asit, DPPH serbest radikal giderim, ABTS katyon radikal giderim ve CUPRAC kapasitesi aktivitesi gösterdi. Böylelikle, elde edilen filmlerin ilave çalışmalar yapıldıktan sonra yaralar için potansiyel yara örtü malzemesi olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

#### 4. Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-B Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında desteklenmiştir (Başvuru numarası: 1139B411900084). Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz. Projede destek olduğu için Doç. Dr. Gülsüm AYDIN'a teşekkür ederiz. Antioksidan çalışmaları için laboratuvar imkânı sağladığı için Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e teşekkür ederiz.

#### 5. Kaynaklar

- Abou-Okeil, A., Fahmy, HM., El-Bisi, MK., Ahmed-Farid, OA. 2018.** Hyaluronic acid/Na-alginate films as topical bioactive wound dressings. *Eur. Polym.J.*, 109:101-109.
- Afshari, MJ., Sheikh, N., Afarideh, H. 2015.** PVA/CM-chitosan/honey hydrogels prepared by using the combined technique of irradiation followed by freeze-thawing. *Radiat. Phys. Chem.*, 113:28-35.
- Akbulut, M., Özcan, MM., Çoklar, H. 2009.** Evaluation of antioxidant activity, phenolic, mineral contents and some physicochemical properties of several pine honeys collected from Western Anatolia. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60(7):577-589.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, SE. 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 7970-7981.

- Arslan, A., Şimşek, M., Dalkıranoğlu-Aldemir, S., Kazaroğlu, NM., Gümüderelioğlu, M. 2014.** Honey-based PET or PET/chitosan fibrous wound dressings: effect of honey on electrospinning process. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 25 (10): 999-1012.
- Basha, S.I., Ghosh, S., Vinothkumar, K., Ramesh, B., Kumari, PHP., Mohan, K.V. M., Sukumar, E. 2020.** Fumaric acid incorporated Ag/agar-agar hybrid hydrogel: A multifunctional avenue to tackle wound healing. *Mater. Sci. Eng. C*, 111:110743.
- Bierhalz, ACK., Westin, C.B., Moraes, AM. 2016.** Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. *Int. J. Biol. Macromol.*, 91:496-504.
- Blois, M.S. 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617):1199-1200.
- Boucard, N., Vitona, C., Agayb, D., Maric, E., Rogerc, T., Chancerelleb, Y., Domard, A. 2007.** The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 28(24): 3478-3488.
- Bölgen, N., Demir, D., Yalçın, MS., Özdemir, S. 2020.** Development of Hypericum perforatum oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. *Int. J. Biol. Macromol.*, 161: 1581-1590.
- Coskun, F., Karabulut-Dirican, L. 2019.** Effects of pine honey on the physicochemical, microbiological and sensory properties of probiotic yoghurt. *Food Sci. Technol, Campinas*, 39(Suppl. 2): 616-625.
- Depan, D., Girase, B., Shah, JS., Misra, RDK. 2011.** Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater.*, 7(9): 3432-3445.
- Dunford, C., Cooper, R., Molan, P. 2000.** Using honey as a dressing for infected skin lesions. *Nurs. Times*, 96:7-9.
- El-Kased, RF., Amer, RI., Attia, D., Elmazar, MM. 2017.** Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. *Sci. Rep.*, 7: 9692.
- Escárcega-Galaz, AA., Sánchez-Machado, DI., López-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, TJ., Paseiro-Losada, P. 2018.** Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *Int. J. Biol. Macromol.*, 116: 472-481.
- Fan, M., Hu, Q., Shen, K. 2009.** Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range. *Carbohydr. Polym.*, 78 (1):66-71.
- Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., Severcan, F. 2015.** Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chem.*, 170: 234-240.



- Gómez-Chabala, LF., Cuartas, CEE., López, MEL. 2017.** Release Behavior and Antibacterial Activity of Chitosan/Alginate Blends with Aloe vera and Silver Nanoparticles. *Mar. Drugs*, 15:328.
- Güneş, YÜ., Eşer, İ. 2006.** Nemli yara iyileşmesi ve oklüsif pansumanların yara iyileşmesindeki önemi. *Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 10 (2):57-65.
- Kamel, NA., Abd El-Messieh, SL., Saleh, NM. 2017.** Chitosan/banana peel powder nanocomposites for wound dressing application: Preparation and characterization. *Mater. Sci. Eng. C*, 72: 543-550.
- Khaleghi, M., Mani, F., Salimi, H., Hajibeygi, M., Pashazadeh, R., Zayerzadeh, E., Babanejad, N., Shabanian, M. 2018.** Synthesis and characterization of new honey incorporated double-network hydrogels based on poly(vinyl alcohol) and acylated chitosan. *Adv. Polym. Technol.*, 37(8):3596-3606.
- Kheradvar, SA., Nourmohammadi, J., Tabesh, H., Bagheri, B. 2018.** Starch nanoparticle as a vitamin E-TPGS carrier loaded in silk fibroin-poly(vinylalcohol)-Aloevera nanofibrous dressing. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 166: 9-16.
- Liang, J., Zhang, K., Li, J., Su, J., Guan, F., Li, J. 2022.** Injectable protocatechuic acid based composite hydrogel with hemostatic and antioxidant properties for skin regeneration. *Mater.Des.*, 222:111109.
- López-Iglesias, C., Barros, J., Ardao, I., Monteiro, FJ., Alvarez-Lorenzo, C., Gómez-Amoza, JL., García-González, CA. 2019.** Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications. *Carbohydr. Polym.*, 204: 223-231.
- Marco, GJ. 1968.** A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45(9):594-598.
- Mazloom-Jalali, A., Shariatnia, Z., Tamai, IA., Pakzad, SR., Malakootikhah, J. 2020.** Fabrication of chitosan-polyethylene glycol nanocomposite films containing ZIF-8 nanoparticles for application as wound dressing materials. *Int. J. Biol. Macromol.*, 153:421-432.
- Mutlu, C., Erbaş, M., Tontul, SA. 2017.** Bal ve Diğer Arı Ürünlerinin Bazı Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda*, 15(1):75-83.
- Nasuti, C., Gabbianelli, R., Falcioni, G., Cantalamessa, F. 2006.** Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutr. Res.*, 26:130-137.
- Neres-Santos, AM., Duarte-Moreira, AP., Piler-Carvalho, CW., Luchese, R., Ribeiro, E., McGuinness, GB., Fernandes-Mendes, M., Nunes-Oliveira, R. 2019.** Physically Cross-Linked Gels of PVA with Natural Polymers as Matrices for Manuka Honey Release in Wound-Care Applications. *Materials*. 12(4):559.
- Nguyen, HTL., Katopo, L., Pang, E., Mantri, N., Kasapis, S. 2019.** Structural Variation in Gelatin Networks From Low to High-Solid Systems Effected by Honey Addition. *Food Res. Int.*, 121: 319-325.
- Oh, GW., Kim, SC., Kim, TH., Jung, WK. 2021.** Characterization of an oxidized alginate-gelatin hydrogel incorporating a COS-salicylic acid conjugate for wound healing. *Carbohydr. Polym.*, 252:117145.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, ME., Topçu, G. 2007.** Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chem.*, 103(2):623-630.
- Parin, FN., Terzioğlu, P., Sıcak, Y., Yildirim, K., Ozturk, M. 2021a.** Pine honey-loaded electrospun poly (vinyl alcohol)/gelatin nanofibers with antioxidant properties. *J. Text. Inst.*, 112(4):628-635.
- Parin FN., Terzioğlu, P., Parin, U., Yeşilyurt, A., Eroğlu, M., Yildirim, K. 2021b.** Fabrication of polyamide 6/honey/boric acid mats by electrohydrodynamic processes for wound healing applications. *Mater. Today Com.*, 29:102921.
- Pataca, LCM., Neto, WB., Marcucci, MC., Poppi, RJ. 2007.** Determination of Apparent Reducing Sugars, Moisture and Acidity in Honey by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Talanta*, 71(5):1926-1931.
- Pita-Calvo, C., Guerra-Rodríguez, ME., Vazquez, M., 2017.** Analytical methods used in the quality control of honey. *J. Agric. Food Chem.*, 65: 690-703.
- Priyadarshi, R., Kumar, SB., Negi, YS., 2018.** Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydr. Polym.*, 195:329-338.
- 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 Radic. Biol. Med.*, 26: 1231-1237.
- Ribeiro, MP., Espiga, A., Silva, D., Baptista, P., Henriques, J., Ferreira, C., Silva, JC., Borges, JP., Pires, E., Chaves, P., Correia, IJ. 2009.** Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen.*, 17(6):817-824.
- Sasikala, L., Rathinamoorthy, R., Dhurai, B. 2018.** Optimization of process conditions for chitosan-manuka honey film as wound contact layer for wound dressings. *Wound Med.*, 23:11-21.
- Sıcak, Y., Şahin-Yağlıoğlu, A., Öztürk, M. 2021.** Bioactivities and phenolic constituents relationship of Muğla thyme and pine honey of Turkey with the chemometric approach. *Food Measure.*, 15: 3694-3707.
- Shepherd, R., Reader, S., Falshaw, A. 1997.** Chitosan functional properties. *Glycoconj. J.*, 14: 535-542.

- Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W. 2016.** Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocoll.*, 61: 695-702.
- Song, L., Yang, H., Liang, D., Chu, D., Yang, L., Li, M., Yang, B., Shi, Y., Chen, Z., Yu, Z., Guo, J. 2022.** A chlorogenic acid-loaded hyaluronic acid-based hydrogel facilitates anti-inflammatory and pro-healing effects for diabetic wounds. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 70:103232.
- Stashak, TS., Farstvedt, E., Othic, A. 2004.** Update on wound dressings: Indications and bestuse. *Clin. Tech. Equine Prac.*, 3(2):148-163.
- Tang, Y., Lan, X., Liang, C., Zhong, Z., Xie, R., Zhou, Y., Miao, X., Wang, H., Wang, W. 2019.** Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydr. Polym.*, 219: 113-120.
- Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No:2020/7), 2020.** <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm>
- Vela, L., De Lorenzo, C., Pérez, RA. 2007.** Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J. Sci. Food Agric.*, 87:1069-1075.
- Wang, T., Zhu, XK., Xue, XT., Wu, DY. 2012.** Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydr. Polym.*, 88:75-83.
- Wahyuningtyas, ES., Iswara, A., Sari, Y., Kamal, S., Santosa, B., Ishijima, T., Nakatani, T., Putri, IK., Nasruddin, N. 2018.** Comparative study on Manuka and Indonesian honeys to support the application of plasma jet during proliferative phase on wound healing. *Clin. Plasma Med.*, 12:1-9.
- Yusof, N., Hafiza, AHA., Zohdi, RM., Bakar, MZA. 2007.** Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing. *Radiat. Phys. Chem.*, 76 (11):1767-1770.
- Zhang, Q., Zhang, M., Wang, T., Chen, X., Li, Q., Zhao, X. 2022.** Preparation of aloe polysaccharide/honey/PVA composite hydrogel: Antibacterial activity and promoting wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.*, 211:249-258.