

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

PROPOLİS VE ARI SÜTÜ İÇEREN CİLT KREMİ: ANTIOKSİDAN, ANTI-HYALÜRONİDAZ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİN DEĞERLENDİRMESİ

Propolis and royal jelly containing skin cream: The evaluation of antioxidant, anti-hyaluronidase, and antimicrobial activities

Gülsüm Merve BOYRACI^{1*}, Atiye DEĞİRMENCİ¹, Oktay YILDIZ^{2,3},
Zeynep Berin ÇELEBİ⁴

¹Gıda İşleme Bölümü, Maçka Meslek Yüksekokulu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, TÜRKİYE, Yazışma yazarı/Corresponding author E-posta: mertveturkut@ktu.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-6036-8072; E-posta: atiyeyaygaz@ktu.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-4767-2667.

²Biyokimya Bölümü, Temel Eczacılık, Eczacılık Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, TÜRKİYE.

³Oktanatura Ar-Ge Mühendislik Hizmetleri Anonim Şirketi, Trabzon, TÜRKİYE, E-posta: oktayyildiz@ktu.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-0436-682X.

⁴Eczacılık Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, TÜRKİYE, E-posta: zeynepberincelebi@gmail.com, ORCID No: 0009-0001-2606-8973.

Geliş Tarihi / Received: 04.09.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 24.10.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1355264

ÖZ

Propolis ve arı sütü eski çağlardan beri geleneksel ve modern tıpta çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı kullanılmıştır. Günümüzde yapılan son çalışmalar bu ürünlerin cilt tedavisi ve bakımı alanındaki potansiyel uygulamalarını ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı, cilt kremi üretiminde propolis ve arı sütünün potansiyel kullanımını incelemek ve arı ürünleriyle zenginleştirilmiş cilt kremi formülasyonunun anti-hyaluronidaz, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmektir. Ayrıca kremlerin farklı depolama sıcaklığı ve süresindeki fiziksel stabilitesi de incelenmiştir. Krem formülasyonunda arı sütü oranı (%0,5) sabit tutulurken propolis özütü %0,5-1,0-1,5 oranlarında kullanılmıştır. Çalışmada üretilen kremlerin pH değerleri 5,56 ile 6,02 aralığında değişmekte olup cilt pH değerine uygun bulunmuştur. Krem formülasyonunda propolis oranı arttıkça antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p \leq 0,05$). Krem örneklerinin anti-hyaluronidaz aktivite analizi sonucu IC_{50} değerleri 0,1667-3,3460 g/mL krem olarak belirlenmiş ve en yüksek aktivite %1,5 propolis özütü ilaveli örnekte bulunmuştur. Propolis ve arı sütü ilaveli krem örneklerinin tamamı *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı inhibisyon göstermiştir. Hızlandırılmış stabilite testleri krem formülasyonun tüm stres koşullarına karşı dikkate değer bir stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışma kozmetik sektöründe doğal, sürdürülebilir ve güvenli cilt bakım ürünleri üretebilmek için krem formülasyonuna arı ürünlerini entegre etmenin uygulanabilirliğine dair kanıt sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Arı sütü, Krem, Cilt yenileyici etki, Anti-hyaluronidaz aktivite

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ABSTRACT

Propolis and royal jelly have been used in traditional and modern medical practices since earlier times, owing to their diverse range of biological activities. Recent studies have demonstrated the potential application of these products in the field of skin treatment and care. The purpose of this study is to examine the potential application of propolis and royal jelly in cream formulation and to evaluate the anti-hyaluronidase, antioxidant, and antimicrobial activities of skin cream formulation enriched with bee products. It was also investigated the physical stability of creams at various storage temperatures and durations. The cream formulation maintained a ratio of royal jelly at 0,5% while varying amounts of propolis extract ranging from 0,5% to 1,0% to 1,5% were utilized. The pH values of the creams examined in the study ranged from 5,56 to 6,02, indicating that they were compatible with the pH value of the skin. It was observed that the antioxidant activity values increased statistically as the propolis ratio increased in the cream formulation. As a result of the antihyaluronidase activity analysis of the cream samples, the IC₅₀ values were determined as 0,1667-3,3460 g/mL cream and the sample with 1,5% propolis extract showed the highest activity. The cream samples with propolis and royal jelly exhibited inhibitory activity against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Candida albicans*. The results of accelerated stability testing indicate that the cream formulation exhibits exceptional stability when subjected to various stress situations. This study provides evidence of the feasibility of integrating bee products into cream formulation to produce natural, sustainable, and safe skin care products in the cosmetics industry.

Keywords: Propolis, Royal jelly, Cream, Skin regenerating effect, Anti-hyaluronidase activity

EXTENDED ABSTRACT

Aim: Today, there is a growing interest in cosmetics containing natural biologically active substances derived from bee products. Propolis and royal jelly, which are bee products, are utilized in numerous therapeutic and cosmetic skin products, including balms, creams, lotions, and lipsticks, due to their moisturizing, skin regenerating, and antiseptic properties.

The objective of this study is to investigate the potential utilization of propolis and royal jelly in the formulation of creams, as well as to assess the effects of these bee products on the anti-hyaluronidase, antioxidant, and antibacterial properties of the creams.

Material and Method: In present study developed a design of a cream formulation comprising various ratios (0,5%,1%, and 1,5%) of propolis extract combined with a fixed ratio (0,5%) of royal jelly. In order to assess the physicochemical and biochemical impacts of royal jelly and propolis on the cream formulation, a control sample was employed. Propolis extract was prepared with 70% glycol solvent and lyophilized royal jelly was used in this study. The Folin–Ciocalteu method was employed to measure the total phenols content, whereas the determination of total flavonoid content was conducted using the aluminum chloride colorimetric

method. The inhibition of the hyaluronidase enzyme was conducted with the methodology suggested by the Sigma protocol, and the results are reported as IC₅₀ values. The antibacterial activity of creams was tested with the disc diffusion method against *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis*, and *C. albicans*.

Results: The pH values of the creams containing propolis and royal jelly exhibited a range of 5,26 to 5,54. According to statistical analysis, the cream sample containing 1,5% propolis extract exhibited the greatest total phenolic content (TPC), total flavonoid (TF) content, and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) values. The TPC, TF, and FRAP values were determined to be 0,786±0,101 mg GAE/g cream, 0,489±0,033 mg QE/g cream, and 4,004±0,378 µmol TE/g cream, respectively. All cream samples displayed antihyaluronidase activity, with Cream 3 having the lowest IC₅₀ value of 0,16672 g/mL. Furthermore, the IC₅₀ values of propolis and royal jelly were found to be 0,00632 and 0,00504 g/mL, respectively. A significant enhancement in the inhibitory effect against *S. aureus* and *S. epidermis* bacteria was seen when the concentration of propolis extract was raised from 0,5% to 1,5%. The cream formulations were subjected to storage at temperatures of 4, 25, and 40°C for a duration of 30 days. Throughout this period, the pH levels, color, and skin feel attributes of the creams exhibited

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

stability, with no observable phase separation occurring.

Conclusion: According to the current findings, the cream formulation enhanced with propolis and royal jelly contains bioactive components resulting in a range of beneficial effects such as antioxidant, antihyaluronidase, and antibacterial. The use of royal jelly, which can degrade and oxidize swiftly due to its structure, together with propolis has increased royal jelly's resistance to deterioration in cosmetics. The stability findings indicated that the emulsion structure and visual characteristics of the creams were consistent across various stress conditions, with no observable indications of phase separation. In addition, this study on the development of a cream formulation containing propolis and royal jelly is a preliminary study and has proven the usability of similar ingredients in skin rejuvenating and wrinkle-removing cosmetic products. Furthermore, these cream formulations have exhibited potential in the development of skin products intended for the treatment of diverse skin ailments caused by *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. Epidermis*, and *C. albicans*.

GİRİŞ

Son yıllarda, sanayileşmiş ülkelerde doğal kaynaklardan elde edilen ilaç ve kozmetik ürünlere yönelik eğilim artmaktadır. Birçok araştırmacı, kozmetik ürünlere çeşitli biyolojik kaynaklardan elde edilen doğal bileşiklerin potansiyel kullanımlarını araştırmaktadır (Lee ve Hyun 2023). Arı ürünleri yüzyıllardır gıda, tıbbi ve kozmetik amaçlarla kullanılmış olup, gün yüzüne çıkarılan yeni özellikleri sayesinde kullanımları her geçen gün artarak devam etmektedir (Kowalczyk vd. 2023). Bal, propolis, arı sütü, polen, arı zehri, bal mumu gibi arı ürünleri biyoaktif özellikleri nedeniyle ilaç ve kozmetik ürünlerinin önemli bileşenleri olarak değerlendirilmektedirler (Kurek-Górecka vd. 2020).

Propolis; yaprak tomurcukları, zamk, bitki salgıları ve çiçekler gibi çeşitli bitkisel unsurların bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanarak enzimler ile muamelesi sonucu dönüştürdüğü reçinemi bir maddedir (Sá vd. 2023; Turkut vd. 2019). Propolis, arı kovanlarında boşlukları kapatma, mikroorganizmaları ve böcekleri uzak tutma, hava akışını ve sıcaklığı düzenleme, su sızmasına karşı etkili bir bariyer oluşturma gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Sá vd. 2023, Dizman vd. 2020).

Propolisin sahip olduğu zengin fenolik bileşenlerden kaynaklandığı düşünülen birçok biyolojik özelliğini değerlendirmek amacıyla sayısız *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Bu özellikler arasında antimikrobiyal, antioksidan, yara iyileştirici, antiparaziter, antiviral, anti-inflamatuar, antikanser ve antidiyabetik etkiler bulunmaktadır (Belmehti vd. 2023, Dizman vd. 2020; Kowalczyk vd. 2023, Rocha vd. 2023). Bu etkiler göz önüne alınarak propolis içeren birçok ürün üretilmiş ve ticarileştirilmiştir. Bunlar arasında sağlık odaklı gıda ve içecekler ile kozmetik ürünler de yer almaktadır (Bankova vd. 2016). Propolisin kozmetikte kullanımı, özellikle kolajen üretiminin uyarılması da dahil olmak üzere cilt üzerindeki yararlı bakteriyostatik ve yenileyici etkileriyle ilişkilidir (Olczyk vd. 2014).

Arı sütü (RJ), 5-15 günlük yaştaki işçi arıların üst çene ve boğaz bezleri tarafından üretilen bir maddedir ve bal arısı larvalarının diyetinin önemli bir bileşenidir. Bal arısı kolonisindeki kастların farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır (Bărnuțiu vd. 2011; Pavel vd. 2011). Arı sütü hem geleneksel hem de modern tıpta yaygın olarak kullanılan bir gıda takviyesidir. İnsanlar için alternatif tıpta kullanılan en etkili ve faydalı arı ürünlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Çok sayıda serbest amino asit, protein, karbohidrat, lipit, vitamin, enzim, hormon, oligo-element ve doğal antibiyotik bulunması sayesinde arı sütü, antioksidan, antimikrobiyal, yaşlanma karşıtı, yara iyileştirici, antiinflamatuar gibi çok çeşitli özelliklere sahiptir (Bărnuțiu vd. 2011, Civelek 2022 Pavel vd. 2011). Antioksidatif, antibakteriyel, antiinflamatuar ve yara iyileştirici özelliklerin varlığı, arı sütünü kozmetik ve cilt bakımı formülasyonlarına dahil edilmek için oldukça uygun bir bileşen haline getirmektedir (Civelek 2022). Arı sütü, dokulardaki metabolizmanın uyarılması nedeniyle dokuların rejeneratif süreçlerini iyileştirme özelliğine sahiptir. Kremlerde, balzamlarda ve losyonlarda yenileyici, besleyici ve iyileştirici özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır (Kurek-Górecka vd. 2020).

Hyalüronik asit (HA) bağ doku hücreleri tarafından membranda sentezlenen ve ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir glikozaminoglikan türüdür. Hücre dışı matriksin ana bileşeni olarak atfedilmekte olup vücutta dokuları bir arada tutma fonksiyonuna sahiptir (Atagün 2022). HA, cildin nemlendirilmesi, yaşlanma karşıtı etkisi, cildin elastikiyetini iyileştirmesi gibi etkileri ile neredeyse tüm kozmetik ürünlerinde popüler bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Yasin vd. 2022). Hyalüronidaz,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

vücuttaki HA'ı hidrolizleyen bir enzim olup HA üzerindeki kontrolsüz aktiviteleri ciltte nem kaybına yol açarak cilt yaşlanmasını ve çeşitli cilt bozuklukları tetikleyebilmektedir (Papaemmanouil vd. 2022). Doğadaki birçok bileşenin yapısında bulunan polifenoller, flavonoidler, sinamik asit türevleri ve lipid asitler doğal hyaluronidaz inhibitörleri olup antioksidan, antimikrobiyal, yaşlanma karşıtı ve kırışıklık karşıtı potansiyellere sahiptir (Girish vd. 2009; Papaemmanouil vd. 2022). Son yıllarda kozmetik endüstrisi, doğal bileşenlerden yapılmış yeni cilt bakım ürünleri geliştirmeye ve bu bileşenlerin kaynaklarını da içeren şekilde ekoloji dostu ürünleri desteklemeye ilgi duymaktadır. Bu ürünlerin doğal antioksidanlar, anti-inflamatuar ve yaşlanma karşıtı bileşenlerle zenginleştirilmiş bir formda piyasaya sunulması ile çevre dostu ürünlerin üretiminin teşvik edilmesi amaçlanmaktadır (Dini ve Laneri, 2021). Bu çalışmanın amacı, kozmetik olarak kullanılabilir cilt yenileyici etkiye sahip propolis ve arı sütü içeren stabil bir cilt kremi formülasyonunu geliştirmektir. Ayrıca geliştirilen krem formülasyonlarının antiyaluronidaz, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Propolis ekstraktlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılan propolis ve arı sütü 2022 yılında Gümüşhane ilindeki yerel arıcılardan temin edilmiştir. Propolis ekstraktı, Yıldız (2020)'de belirtilen yöntemin modifiye edilmesi ile hazırlanmıştır. Ekstraksiyondan önce ham propolis laboratuvar tipi öğütücüde (Waring, HGB2WTG4, ABD) öğütülmüş ve 30 g ham propolis üzerine 70 mL glikol (%50'lik) ilave edilerek 60 °C'de 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde (60 rpm) (Microtest, MC55, Ankara, Türkiye) ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

Arı sütü ve propolis içeren kremler formülasyonunun hazırlanması

Propolis ve arı sütü içeren krem üretiminde üç farklı propolis oranı (%0,5-1-1,5) ve %0,5 sabit oranda arı sütü kullanılmıştır. Propolis ve arı sütünün krem örneklerinin biyolojik aktivite ve stabiliteyi üzerine etkilerinin kıyaslanması amacıyla propolis ve arı sütü içermeyen kontrol örneği ile çalışılmıştır. Krem formülasyonu Tanuğur Samancı ve Kekeçoğlu (2022)'nin çalışmalarında belirtilen yöntemin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Krem üretiminde su fazı 60 °C'deki saf suya %0,1

oranında keçiyoynuzu zamkı ve %10 oranında gliserin eklenmesi ve 10 dk karıştırıldıktan sonra sıcaklığın 30 °C'ye düşürülmesi ve ardından %0,5 oranında arı sütü ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Yağ fazının oluşturulmasında ise stearyl alkol (%10), shea yağı (%10), balmumu (%7), avokado yağı (%6) ve zeytinyağı (%6) tartılarak ayrı bir beherde 60 °C'de karıştırılmıştır. Homojen hale gelen karışımın sıcaklığı 65 °C'ye düşürülerek E vitamini ve belirtilen oranlarda propolis eklenerek 10 dakika daha karıştırılmıştır. Son olarak su ve yağ fazı homojenizatör (IKA,T-18B, Ultra-Turrax, Almanya) kullanılarak birleştirilmiş ve ambalajlara alınmıştır. %0,5 propolis ilaveli krem örneği Krem 1, %1,0 ve %1,5 propolis özütü içerenler kremler ise sırasıyla Krem 2 ve Krem 3 olarak kodlanmıştır.

Biyokimyasal analizler ve antimikrobiyal analiz için 1 g krem örneği üzerine 10 mL metanol eklenip 15 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edikten sonra çökelti dışındaki üst faz alınarak analizlerde kullanılmıştır (Dorken 2022).

Krem örneklerinin hızlandırılmış stabilite testleri

Kremlerin emülsiyon stabilitesinin belirlenmesi amacıyla üretimden 24 saat sonra +4 °C ± 0,1 °C, 25 °C ± 0,1 °C ve 40 °C ± 0,1 °C'de farklı sıcaklık stresi altında 30 gün süreyle hızlı yaşlandırmaya maruz bırakılmıştır. Takip sırasında pH, renk, toplam canlı ve maya-küf analizleri ve duyuşsal (görünüş, faz ayrımı, koku, ciltte his) analizleri yapılmıştır (Srisuksomwong vd. 2023).

Krem örneklerinin pH değerleri Ordu vd (2018)'de belirtildiği şekilde 0,5 g örnek alınarak 50 mL saf suda çözündürüldü ve pH değerleri ölçüldü (Hanna Instrument, pH 211, Romanya). Renk analizleri için kremler renk ölçüm kabına altına hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde ve ışığı geçirmeyecek kalınlıkta (1cm) yayılmıştır. Minolta marka renk ölçüm cihazı (Minolta, CR5, Japonya) kullanılarak ölçümler yapılmış ve L^* (parlaklık), a^* (+: kırmızı, -: yeşil) ve b^* (+: sarı, -: mavi) değerleri açısından değerlendirilmiştir (Muriel-Galet vd. 2015). Krem örneklerinden 1g alınıp 9 mL %0,1'lik steril peptonlu su ile karıştırıcıda 3 dk karıştırıldıktan sonra steril peptonlu su ile desimal dilüsyonları (10^{-9} 'a kadar) hazırlanarak dökme plak yöntemiyle çalışıldı. Örneklerin toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayımı için Plate Count Agar (PCA) besiyeri kullanılmış olup örnekler 35 °C'de 48 saat (FDA-BAM, 2001a) ve maya küf sayımı için Malt Extract Agar (MEA) besiyerinde 25 °C'de 5 gün inkübasyon

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sonunda koloni sayımları yapılmıştır. Sonuçlar kob/g olarak ifade edilmiştir (FDA-BAM, 2001b).

RP-HPLC-PDA ile fenolik bileşenlerin tayini

Propolis ekstraktının fenolik bileşen kompozisyonunun belirlenmesi için 10 mL ekstraktın seyreltik HCl kullanılarak pH değeri 2'ye ayarlanmıştır. Sonrasında 10 mL dietil eter ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk 200 rpm hızda çalkalamalı su banyosunda (Nüve, ST-30, Ankara, Türkiye) çalkalanmıştır. Üst fazın alınmasından sonra aynı işlem 5 mL daha dietil eter ilavesi ile tekrarlanmıştır. Aynı prosedür etil asetat kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çözücü 40 °C'de evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kalıntı 2 mL metanolde çözülüp 0,45 µM filtreden geçirilmiştir (Kara 2020).

Propolis ekstraktının fenolik kompozisyonun belirlenmesinde 25 standart fenolik madde (*m*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, ellagik asit, daidzein, rutin, gallik asit, epikateşin, şiringik asit, *t*-sinnamik asit, hesperetin, krisin, pinosembrin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit, kafeik asit, apigenin, resveratrol, kafeik asit fenil ester (CAPE), myrisetin, luteolin, kuersetin, ramnetin ve kurkumin) ile çalışılmış olup analizler HPLC cihazında (Shimadzu Corporation, LC 20AT, Kyato, Japonya) PDA dedektör kullanılarak yapılmıştır. Analizde ters faz C18 kolonu (150 mm x 4,6 mm, 5 µm; Fortis) kullanılarak ikili çözücü gradient programı (A: %2 asetik asit (saf suda); B: %70 asetonitril (saf suda)) uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Yıldız ve Boyraci 2020). Kolon sıcaklığı 30 °C, akış hacmi 1,0 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL şeklindedir.

Toplam fenolik madde tayini

Krem örnekleri, propolis ve arı sütünün toplam fenolik madde (TFM) içeriği Folin Ciocalteu metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Slinkard ve Singleton 1977). Sırasıyla 20 µL örnek, 680 µL saf su ve 400 µL 0,2 N Folin Ciocalteu reaktifi karıştırılarak 3 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Ardından %10'luk 400 µL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda koşullarında 2 saatlik inkübasyon sonucunda UV-Vis spektrofotometre (Biochrom Libra) ile 760 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda gallik asit kullanılmış olup sonuçlar mg gallik asit eş değeri (GAE) / g örnek olarak verilmiştir.

Alüminyum klorür yöntemi ile toplam flavonoid tayini

Örneklerin flavanoid içeriği Balkan vd. (2018)'de belirtilen alüminyum klorür metodunun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Analizde 60 µL örnek üzerine 540 µL metanol ve 600 µL %2'lik metanolik AlCl₃ çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübasyon sonrası spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülmüştür. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL) hazırlanan kuersetin çözeltileri kullanılmış ve sonuçlar mg KE (kuersetin eş değeri)/ g örnek olarak verilmiştir.

Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayini

Örneklerin antioksidan kapasite tayini Troloks eşdeğeri olarak Benzie ve Strain (1999) tarafından geliştirilen yöntemin modifikasyonu ile belirlenmiştir. FRAP reaktifi sırasıyla 10:1:1 oranlarında 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (40 mM HCl ile hazırlanan), 0,3 M asetat tampon çözeltisi (pH 3,6) ve 20 mM FeCl₃ çözeltisinin karıştırılması ile taze olarak hazırlanmıştır. Test prosedürü 50 µL örnek ve 1,5 mL of FRAP reaktifinin karıştırılarak 37 °C'de 4 dakika inkübe edilmesi ve devamında spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülmesi şeklindedir. Sonuçlar µmol Troloks eşdeğeri (TE) / g örnek olarak verilmiştir.

Hyaluronidaz enzim inhibisyonu

Hyaluronidaz enzim inhibisyonu tespiti Sigma tarafından önerilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılması ile gerçekleştirilmiştir (Yahaya ve Don 2012). Test tüpüne sırasıyla 100 µL enzim (1,67 ünite), 100 µL fosfat tamponu (pH 7) ve 25 µL örnek eklendikten sonra 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Devamında reaksiyon, hyalüronik asit çözeltisi (sodyum fosfat içinde %0,01 hyalüronik asit, pH 5.35) formundaki substrattan 100 µL ilave edilerek başlatılmış ve 37 °C'de 40 dakika inkübasyon yapılmıştır. Süre sonunda 1 mL asetat tamponu (pH 3,75) ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve reaksiyonu durdurmak için tüpler kaynar su banyosunda 1 dk tutulmuştur. 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Antimikrobiyal aktivite tayini

Propolis, arı sütü ve krem örneklerinin antimikrobiyal etkinliği *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 *Bacillus cereus*,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Staphylococcus epidermis ve *Candida albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı agar kuyucuk yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Besi yeri olarak kullanılan Mueller Hinton agar (MHA) üzerine bakteriler için 0,5 ve maya için 2,0 Mc Farland bulanıklık standardı eşdeğeri kültürler steril eküvyon çubuğu kullanılarak sürüldü. Besi yeri üzerine steril mantar delici (6 mm çap) ile oyuklar açılarak her oyuğa 50 µL örnek ilave edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oyukların etrafında oluşan zon çapları (mm) ölçülmüştür (Sönmez 2023).

İstatistiksel analiz

Çalışmadaki tüm analizlerin sonuçları SPSS 20.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm analizler üç paralel halinde gerçekleştirilmiş olup sonuçlar ortalama ve standart sapması olarak ifade edilmiştir. Ortalama değerler arasındaki farkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Duncan çoklu karşılaştırma testi yapıldı ($p \leq 0,05$).

BULGULAR

HPLC ile fenolik bileşen tayini sonuçları

Çalışmada kullanılan propolis ekstraktının (0,3 g/mL) fenolik bileşenleri Tablo 1'de verilmiştir. Glikolik propolis ekstraktında fenolik bileşenlerden en yüksek konsantrasyonda 14,6±0,13 mg/g CAPE ve en düşük konsantrasyonda 0,31±0,01 mg/g apigenin tespit edilmiştir.

Propolis ve arı sütü ilaveli kremlerin antioksidan potansiyelin değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan propolis ve arı sütünün toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TF) ve FRAP analizi sonuçlarında istatistiksel olarak farklılık gözlenmiş ve en yüksek değerleri propolis ekstraktı (0,3 g/mL) göstermiştir. Propolis ve arı sütünün TFM değeri sırasıyla 364,488±8,387 ve 1,207±0,008 mg GAE/g örnek ve TF değerleri sırasıyla 62,037±8,021 ve 0,980±0,007 mg KE/g örnek şeklinde bulunmuştur. Demir indirgeme gücü değerleri ise propolis ekstraktının 429,842±5,770 µmol TE/g örnek ve arı sütünün 1,702±0,140 µmol TE/g örnek olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. Propolis ekstraktının fenolik madde kompozisyonu

Table 1. Phenolic composition of propolis extract

Bileşen	Konsantrasyon (mg/g)
Kafeik asit	2,17±0,03
Kumarik asit	1,41±0,01
Ferulik asit	1,83±0,05
Trans-sinamik asit	1,70±0,02
CAPE	14,6±0,13
Epikateşin	1,97±0,02
Apigenin	0,31±0,01

Üretilen krem örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde içerikleri ve antioksidan aktivite sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Kremlerin toplam fenolik madde miktarları 0,786±0,101 ile 0,089±0,035 mg GAE/g örnek aralığında bulunmuş olup istatistiksel olarak en yüksek değeri %1,5 oranında propolis ilaveli örnek (Krem 3) göstermiştir. Tüm analizler için propolis ve arı sütü ilaveli örnekler kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p \leq 0,05$).

Tablo 2 Krem örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite sonuçları

Table 2 Results of total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of cream samples

	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g örnek)	Toplam Flavonoid (mg KE/g örnek)	FRAP (µmol TE/g örnek)
Kontrol	0,089±0,035 ^a	0,244±0,006 ^a	1,548±0,251 ^a
Krem 1	0,317±0,066 ^b	0,257±0,041 ^b	2,143±0,262 ^b
Krem 2	0,576±0,124 ^c	0,341±0,032 ^c	3,008±0,348 ^c
Krem 3	0,786±0,101 ^d	0,489±0,033 ^d	4,004±0,378 ^d

^{a-d} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki istatistiksel farklılığı simgelemektedir ($p \leq 0,05$)

^{a-d} Different letters in the same column indicate the statistical difference between the samples ($p \leq 0,05$)

Stabilite testleri

Krem formülasyonunda en önemli noktalarından biri de emülsiyon stabilitesinin sürekliliğidir. Üretilen

krem örneklerinin stabilite çalışmaları 4 °C, 25 °C ve 45 °C'de 30 gün boyunca gerçekleştirilmiş olup pH, TMAB, maya-küf, renk, koku, faz ayrımı ve ciltte his

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

gibi analitik ve organoleptik özellikleri değerlendirilmiştir (Srisuksomwong vd. 2023).

Stabilite sonuçları test edilen çeşitli saklama koşulları altında krem formülünün fiziksel özelliklerinin kararlı olduğunu gösterdi. Tüm krem örneklerinde faz ayrımı gözlenmemiş ve herhangi bir yabancı koku oluşmamıştır. Ciltte yumuşak ve kolay dağılılabılır yapı sergilemiştir.

pH analizi sonuçları

Üretilen propolis ve arı sütü içeren kremlerin tümünün pH değeri 5,25 ile 5,56 aralığında değişmiş ve kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılık göstermiştir (Tablo 3). Tüm krem örneklerinde farklı sıcaklıklarda depolama periyodu boyunca pH

değerlerinde istatistiksel olarak stabilite sağlandığı belirlenmiştir.

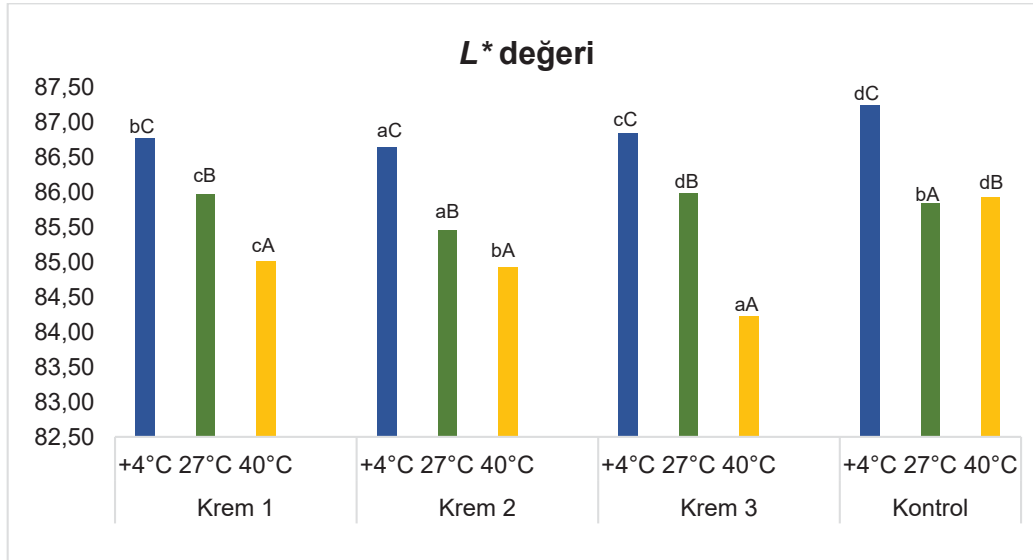
Renk analizi sonuçları

Propolis ve arı sütü ilaveli krem örneklerinin depolama günü sonunda farklı sıcaklıklarda ölçülen renk değerleri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir. Örneklerin üretildiği gün (0. Gün) L^* değeri 87,50-86,44, a^* değeri 0,33-0,24 ve b^* değeri 18,50-24,67 aralığında değişmiştir (veri verilmemiştir). Kremlerin +4, 25 ve 40 °C'deki L^* parlaklık değerleri sırasıyla 86,63-87,23; 85,44-85,983ve 84,22-85,92 aralığında değişmiş olup depolama sıcaklığı arttıkça L^* parlaklık değerlerinin istatistiksel olarak azaldığı (Kontrol grubu hariç) görülmüştür (Şekil 1).

Tablo 3. Krem örneklerinin farklı sıcaklıklarda depolama süresince pH değerleri

Table 3. pH values of cream samples during storage at different temperatures

Örnek	+4 °C		27 °C		40 °C	
	0. gün	30. gün	0. gün	30. gün	0. gün	30. gün
Kontrol	6,02	6,03	6,03	6,03	6,03	6,03
Krem 1	5,54	5,56	5,52	5,53	5,52	5,52
Krem 2	5,49	5,49	5,50	5,50	5,50	5,50
Krem 3	5,25	5,26	5,26	5,27	5,26	5,26



Şekil 1. Krem örneklerinin depolama sıcaklığına bağlı L^* değerleri

^{a-d} Küçük harfler farklı krem formülasyonlarının aynı sıcaklıktaki L^* değerlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p \leq 0,05$).
^{A-C} Büyük harfler aynı krem örneği için farklı sıcaklıklarda ölçülen L^* değerlerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,05$)

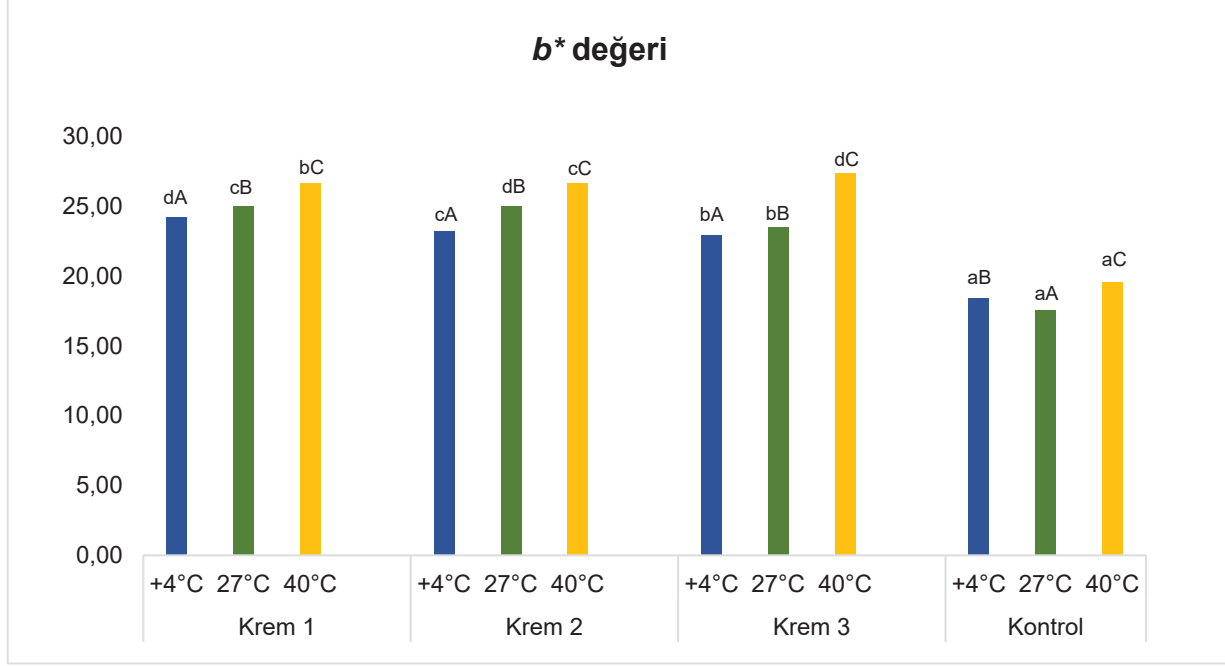
Figure 1. L^* values of cream samples depending on storage temperature

^{a-d} Lowercase letters indicate statistical differences in L^* values of different cream formulations at the same temperature ($p \leq 0,05$).
^{A-C} Capital letters indicate statistical differences in L^* values measured at different temperatures for the same cream sample ($p \leq 0,05$)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Örneklerin sarılık ($+b^*$) değerlerinin depolama sıcaklığı ile arttığı tespit edilmiştir. Depolama sıcaklıklarının tümü için kontrol grubu en düşük

sarıklık değerini sergilemiş olup propolis ilaveli kremlerin $+b^*$ değerlerinden istatistiksel olarak farklılık sergilemiştir ($p \leq 0,05$).



Şekil 2. Krem örneklerinin depolama sıcaklığına bağlı b^* değerleri

^{a-d} Küçük harfler farklı krem formülasyonlarının aynı sıcaklıktaki b^* değerlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p \leq 0,05$). ^{A-C}Büyük harfler aynı krem örneği için farklı sıcaklıklarda ölçülen b^* değerlerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,05$)

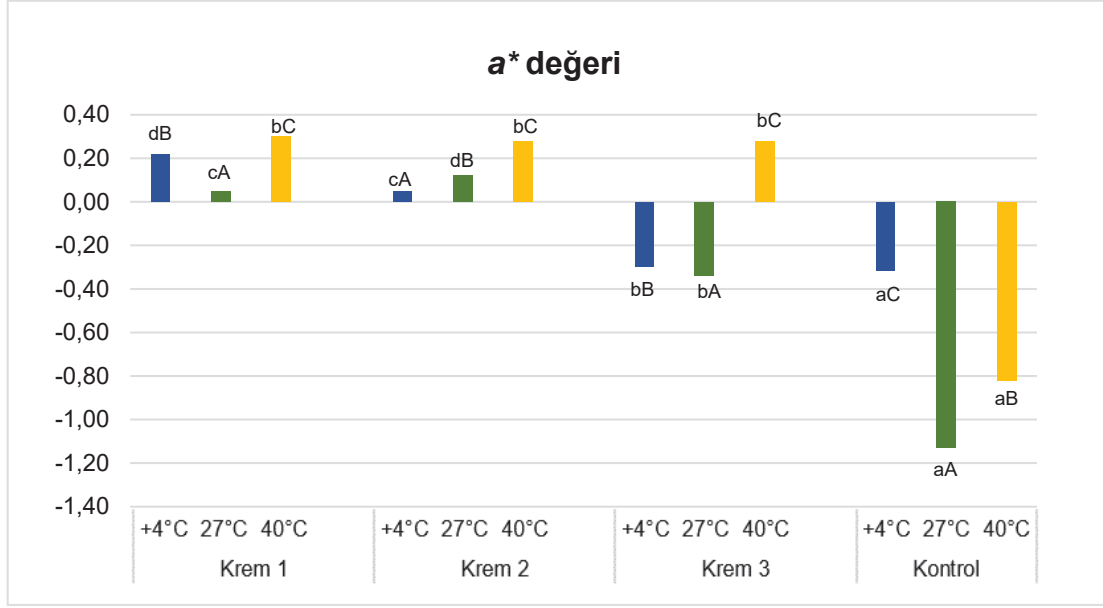
Figure 2. b^* values of cream samples depending on storage temperature

^{a-d} Lowercase letters indicate statistical differences in b^* values of different cream formulations at the same temperature ($p \leq 0,05$). ^{A-C} Capital letters indicate statistical differences in b^* values measured at different temperatures for the same cream sample ($p \leq 0,05$)

Krem örneklerinin a^* değerleri Şekil 3'te verilmiştir. Kontrol grubu dışındaki tüm örneklerde 40 °C sıcaklıkta depolama sonucu örneklerin kırmızılık

değerlerinde istatistiksel olarak artış olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Şekil 3. Krem örneklerinin depolama sıcaklığına bağlı a* değerleri

^{a-d} Küçük harfler farklı krem formülasyonlarının aynı sıcaklıktaki a* değerlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p \leq 0,05$). ^{A-C}Büyük harfler aynı krem örneği için farklı sıcaklıklarda ölçülen a* değerlerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,05$)

Figure 3. a* values of cream samples depending on storage temperature

^{a-d} Lowercase letters indicate statistical differences in a* values of different cream formulations at the same temperature ($p \leq 0,05$). ^{A-C} Capital letters indicate statistical differences in a* values measured at different temperatures for the same cream sample ($p \leq 0,05$)

Antimikrobiyal aktivite Sonuçları

Propolis, arı sütü ve krem örneklerinin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesinde *B. cereus*, *E. coli*,

S. aureus, *S. epidermis* ve *C. albicans* mikroorganizmaları kullanılmış olup inhibisyon zon alanları mm cinsinden Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Propolis, arı sütüne kremlere ait antimikrobiyal aktivite sonuçları

Table 4. Antimicrobial activity results of propolis, royal jelly and creams

	İnhibisyon zonu (mm)				
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>C. albicans</i>
*Propolis	19,65 ± 0,21	4,95 ± 0,21 ^b	20,65 ± 0,21 ^b	22,05 ± 0,07 ^b	22,15 ± 0,91 ^b
*Arı sütü	-	3,00 ± 0,14 ^a	2,90 ± 0,14 ^a	3,90 ± 0,56 ^a	2,95 ± 0,21 ^a
Kontrol	15,35 ± 0,63 ^a	6,05 ± 0,35 ^a	12,25 ± 0,21 ^a	-	-
Krem 1	20,05 ± 0,77 ^b	9,85 ± 0,07 ^b	14,70 ± 1,13 ^b	11,05 ± 0,21 ^a	12,15 ± 1,14 ^a
Krem 2	20,55 ± 0,91 ^b	9,75 ± 0,07 ^b	22,15 ± 1,34 ^c	13,95 ± 0,14 ^b	12,20 ± 0,98 ^a
Krem 3	21,30 ± 0,14 ^{bc}	9,95 ± 0,21 ^b	24,55 ± 0,91 ^d	14,40 ± 0,98 ^b	12,55 ± 1,19 ^a

^{a-d}Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p \leq 0,05$). * Propolis ve arı sütünün inhibisyon çapları kendi aralarında değerlendirilmiştir.

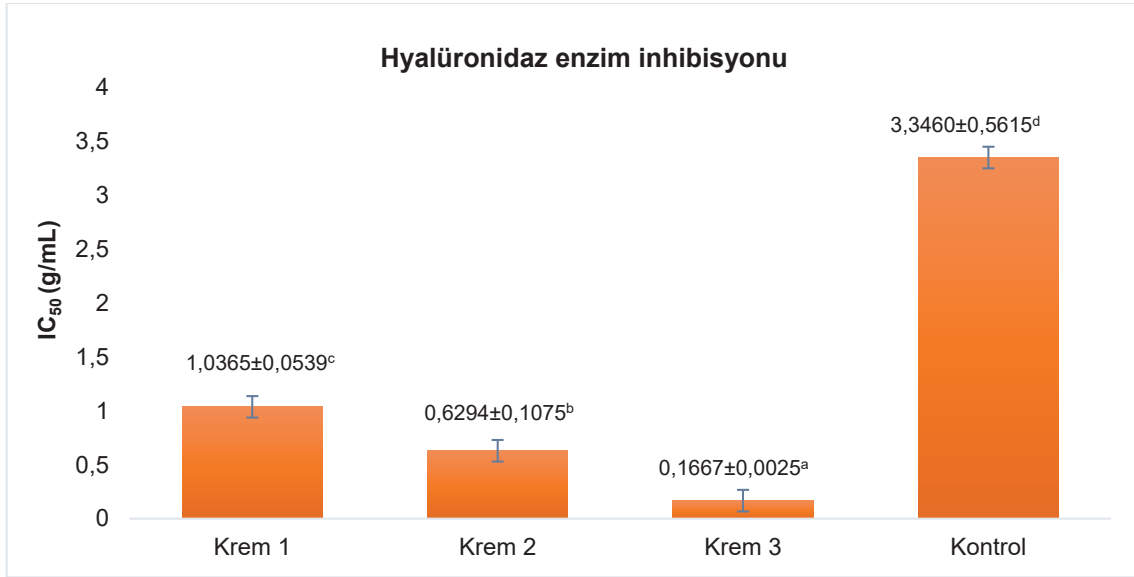
^{a-d} Different letters in the same column indicate statistical difference ($p \leq 0,05$). * The inhibition diameters of propolis and royal jelly were evaluated among themselves.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Propolis ekstraktının çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı inhibisyon sergilediği tespit edilmiştir. Çalışılan konsantrasyonda arı sütünün (0,3 g/ mL) *B. cereus* dışındaki test mikroorganizmalarına karşı etkili olduğu ve $3,90\pm 0,56$ mm zon çapıyla en yüksek *S. epidermis*'e karşı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Propolis ve arı sütü ilaveli krem örneklerinin hepsinde antimikrobiyal etki gözlenmiş ve kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Tüm mikroorganizmalar için en yüksek antimikrobiyal etkiyi %1,5 propolis ilaveli Krem 3 örneği sergilemiştir.

Antihiyalüronidaz aktivite sonuçları

Propolis ekstraktı, arı sütü ve üretilen kremlerin hiyalüronidaz enzimine karşı inhibisyonu ölçülmüş ve sonuçlar IC_{50} (g/mL) olarak ifade edilmiştir. Propolis ve arı sütünün IC_{50} değeri sırasıyla $0,0063\pm 0,0002$ ve $0,0050\pm 0,0003$ g/mL örnek olarak bulunmuştur ve sonuçlar istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Krem örneklerinde en düşük aktiviteyi $3,3460\pm 0,5615$ g/mL örnek değeri ile kontrol kremi sergilerken propolis ve arı sütü ilaveli kremlerde en yüksek aktiviteyi $0,1667\pm 0,0025$ g/mL örnek değeri ile %1,5 propolis ekstraktı ilaveli Krem 3 örneği göstermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Krem örneklerinin hiyalüronidaz enzim inhibisyonu sonuçları (^{a-d} Farklı harfler istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p\leq 0,05$))

Figure 4. Hyaluronidase enzyme inhibition results of cream samples (^{a-d} Different letters indicate statistical difference ($p\leq 0,05$)).

TARTIŞMA

Kozmetik ürünlerinde çeşitli sıcaklıklarda depolama testi, geliştirilen formülasyonların stabilitesini ve etkinliğini belirlemek için kullanılabilir iyi bilinen test yöntemlerindedir (Sonika vd. 2014). Krem formülasyonlarında pH değerleri, etkinlikleri ve stabiliteleri düşünüldüğünde önemli bir parametredir ve insan cilt pH değeri ile uyumlu olması beklenmektedir. Cilt için kabul edilebilir pH aralığı 4,5- 6,5 şeklindedir (Fitzner vd. 2023, Nosheen ve Kaleem 2023, Tranggono ve Latifah 2007). Çalışmada formüle edilmiş krem örneklerinin pH

değerlerinin 5,25 ve 6,03 aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. Propolis ve arı sütü ilave edilerek üretilen kremler istatistiksel olarak kontrol grubundan daha düşük pH değeri sergilerken, artan propolis oranı ürünlerin pH değerinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($p\leq 0,05$). Ayrıca depolama periyodu boyunca farklı sıcaklıklar da dahil olmak üzere tüm krem örneklerinin pH değerleri stabil kalmıştır. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde farklı sıcaklık ve depolama süresi de dahil olmak üzere formülasyonun cilt pH değerine uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Tanuğur Samancı ve Kekeçoğlu (2022)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

çalışmalarında %0,3 propolis ekstraktı, %1,0 arı sütü ve %0,1 oranında arı zehri içeren cilt kremi formülasyonu geliştirmiş ve oda sıcaklığı ve 40 °C'de sıcaklıkta 90 gün boyunca stabilite takibi yapmıştır. Oda sıcaklığında ve 40 °C'de muhafaza edilen kremlerin pH değerleri sırasıyla pH 6,4-7,6 ve 7,6-6,7 aralığında değişmiştir.

Bilindiği üzere propolis toplandığı bölgeye bağlı olarak kırmızımsı kahve, yeşil, sarı ve koyu kahverengi renklere sahiptir (Polat vd. 2023). Kremlerin stabilitesini değerlendirirken farklı depolama sıcaklıklarına bağlı renk değerleri ölçülmüş ve propolis ve arı sütü ilaveli kremlerin L^* , a^* ve b^* değerleri kontrol örneğinden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Krem formülasyonuna propolis ilave edilmesi ile $+a^*$ (kırmızılık) ve $+b^*$ (sarılık) değerlerinde artış, $+4$ °C ve 40 °C'deki parlaklık değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu etkinin propolis ve arı sütünün orijinal renklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı şekilde *Saccharina japonica* (alg türü) özütünün cilt üzerine nemlendirici aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, kahverengi alg ekstraktı ilaveli kremlerin kontrol örneğine göre L^* ve a^* değerlerinde belirgin azalma görülmüştür.

Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne İlişkin Kılavuz'unda 3 yaş altı çocuklara ve diğer bireylere uygulanan kozmetik ürünlerinin toplam canlı aerobik mezofilik mikroorganizma sayısının (bakteri, maya ve küf) sırasıyla maksimum 10^2 kob/g ve 10^3 kob/g olacağı belirtilmiştir (TİTCK 2023). Ayrıca yine bu kılavuzda kozmetik ürünlerinin mikrobiyal güvenliği için *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Escherichia coli* bulunmaması gerektiği bildirilmiştir. Çalışmada geliştirilen formüle kremlerin tümünde toplam bakteri ve maya-küf analizinde koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Bu durumun antimikrobiyal etkinlik de gösterdiği bilinen propolis ve arı sütünden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Sonuçlarımız kozmetik ürünlerinin mikrobiyolojik kriterler kılavuzuna uygun olup geliştirilen vücut kremlerinin hem çocuklar hem de yetişkinler tarafından kullanılabilmesi görülmektedir.

Propolis fenolik asitlerce zengin olarak bilinen başlıca arı ürünüdür, bununla birlikte kimyasal içeriği toplandığı bölge, hasat zamanı, iklim, ekstraksiyon parametreleri gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Kolaylı vd (2023), çalışmalarında Karadeniz Bölgesinden toplanan 8 farklı ham

propolis örneğinin HPLC ile tespit edilen fenolik bileşen miktarları mg/ g cinsinden kafeik asit 1,107-2,073; kumarik asit 0,414-2,161; ferulik asit 0,681-3,612; *t*-sinnamik asit 0,455-1,811; CAPE 2,939-5,388, apigenin 0,288-1,132 mg/g olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan propolis ekstraktının sergilemiş olduğu fenolik profil literatür ile uyumluluk göstermiştir. Bu durum her iki çalışmada kullanılan propolisin aynı bölgeden temin edilmesi ile doğrudan ilişkilendirilebilir.

Propolis özütü ve arı sütünün toplam fenolik madde içeriği sırasıyla $364,488 \pm 8,387$ ve $1,207 \pm 0,008$ mg GAE/g örnek olarak bulunmuştur. Can vd. (2022) tarafından 11 propolis örneğinin antioksidan özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada TFM değerlerinin $52,9 \pm 0,1$ - $203,5 \pm 1,4$ mg GAE/g ve TF değerlerinin $13,6 \pm 0,3$ - $43,9 \pm 0,1$ mg KE/g olarak bulunurken, bir başka çalışmada glolik propolis ekstraktının TFM değerleri $61,91 \pm 1,62$ mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan propolis özütünün FRAP değeri $982,31 \pm 69,46$ μ mol FeSO₄.7H₂O/g propolis olarak bulunurken Marmara bölgesinden toplanan 11 örneğin değerlendirildiği çalışmada ortalama FRAP değerleri $325,4 \pm 131,8$ μ mol FeSO₄.7H₂O/g propolis olarak belirtilmiştir (Can vd. 2022). Sönmez (2023), Anadolu arı sütünün biyolojik aktivitesini değerlendirdiği çalışmada, arı sütünün TFM ve FRAP değerlerini sırasıyla $4,86 \pm 0,02$ mg GAE/g ve $2,00 \pm 0,03$ μ mol Trolox/g olarak belirtmiştir. Bu bağlamda propolis ve arı sütü örneklerinin antioksidan potansiyelleri diğer araştırma bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Krem örneklerinin antioksidan potansiyeli değerlendirildiğinde propolis ve arı sütü içeren kremlerin toplam fenolik madde miktarı $0,317 \pm 0,066$ ile $0,786 \pm 0,101$ mg GAE/g krem aralığında değişmiştir. Mapoung vd. (2021) çalışmalarında 23 farklı fonksiyonel kozmetik kremlerin antioksidan özelliğini incelemiş ve kremlerin toplam fenolik madde içeriklerinin $0,015$ - $1,590$ mg GAE/g krem olarak tespit etmişlerdir. Havlıcan bitkisi ve mikroalg (*Chlorella vulgaris*) içerikli üretilen kremlerin antioksidan aktiviteye etkisinin araştırıldığı çalışmada kontrol kreminin toplam fenolik madde değeri $0,047 \pm 0,001$ mg GAE/g krem bulunurken havlıcan özütü ve *Chlorella vulgaris* içeren kremlerin değerleri sırasıyla $0,279 \pm 0,022$ ve $2,235 \pm 0,006$ mg GAE/g krem olarak belirlenmiştir (Dorken 2022). Farklı meyve ekstraktları kullanılarak hazırlanan kremlerin toplam flavonoid ve antioksidan özelliğinin değerlendirildiği çalışmada, kremlerin toplam flavonoid miktarı $0,0365$ - $0,0532$ mg KE/g krem

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

olarak bulunmuştur (Imam vd. 2015). Literatürdeki bulgular değerlendirildiğinde sonuçlarımız antioksidan zenginleştirilmiş kremler ile uyumluluk göstermiştir.

Propolis ve arı sütü ile formüle edilen kremlerin belirtilen konsantrasyonlarda çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir. Kremlerin inhibitör performanslarının, *S. aureus* ve *S. epidermis*'e karşı propolis oranındaki artışla arttığı görülmüştür. Sadece kontrol kremde *S. epidermis* ve *C. albicans*'a karşı aktivite gözlenmemiştir. *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı krem örneklerinin ortalama zon çapları sırasıyla 19,31; 8,9; 18,41; 13,11 ve 12,30 mm'dir. Chaiwong vd. (2022), kremlerde karboksimetil kitosan ve mangosteen ekstraktının kullanımının antioksidan ve antibakteriyel özellikleri geliştirmesi üzerine yaptıkları çalışmada, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı kremlerin inhibisyon çaplarını sırasıyla 6,6-3,3 ile 6,07-12,4 mm aralığında bulmuştur. *Origanum onites*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus globus* ve *Thymus vulgaris* uçucu yağlarının farklı oranlarda kullanılması ile hazırlanan kozmetik amaçlı krem formülasyonunun antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırılmıştır (Yorgancıoğlu 2012). *Origanum onites* uçucu yağı *S. aureus* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı etki göstermiş ve sırasıyla 9-26 mm ve 11-16 mm zon çapı ölçülmüştür. Çalışmamızdaki formüle kremlerin antimikrobiyal etkinliği mevcut literatür bulgularıyla oldukça tutarlıdır.

Krem formülasyonunda kullanılan propolis ve arı sütünün IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.0063 ve 0.0050 g/mL olarak tespit edilmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan propolislerin sulu ekstraktlarının anti-hyaluronidaz aktivitesinin incelendiği çalışmada kestane ve meşe propolislerinin hyaluronidaz enzim inhibisyonu IC₅₀ olarak hesaplanmış ve sonuçlar sırasıyla 5,0±0,01-5,54±0,02 µg/mL ve 3,26±0,01- 9,21±0,02 µg/mL aralığında bulunmuştur (Can 2018). Arı ürünlerinin hyaluronidaz enzim inhibisyonu üzerine yapılan bir başka çalışmada SC₅₀ değerleri Anzer balında 0,17 g/mL ve polende 0,07 g/mL olarak belirlenmiştir (Hotaman 2015). Kolaylı vd. (2016) çalışmalarında altı farklı botanik orjine sahip balların anti-hyaluronidaz aktivitesi değerlendirilmiş heterofloral ve çam balların IC₅₀ değeri sırasıyla 0,344-0,363 g/mL ve 0,255-0,287 g/mL aralığında bulunmuştur. Çalışmada ayrıca çam balının toplam

fenolik ve flavoid içeriğinin heterofloral ballardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Kremlerin hyaluronidaz enzimine karşı inhibisyon etkinliği değerlendirildiğinde propolis ve arı sütü ilavesinin kontrol kreminde kıyasla istatistiksel olarak farklılığa neden olduğu görülmüş ve artan propolis oranıyla inhibisyonda artış olduğu gözlemlenmiştir. IC₅₀ değerleri enzimin aktivitesini %50 oranında inhibe etmek için gereken inhibitör konsantrasyonu ifade etmektedir ve IC₅₀ değerinin küçük olması inhibisyon aktivitesinin o kadar büyük olması anlamına gelmektedir (Obob vd. 2015). Can (2018) bal, polen ve propolis örneklerinin, Kolaylı vd. (2016) ise farklı bal çeşitlerinin anti-hyaluronidaz aktivitesinin değerlendirildiği çalışmalarında arı ürünlerinde bulunan polifenolik ve flavonoidleri enzim inhibisyonu ile ilişkilendirmiştir. Çalışmalarda örneklerin fenolik içeriği ne kadar yüksekse hyaluronidaz enzim inhibisyonunun o kadar fazla olduğunu belirtilmiştir. Arı ürünlerinin biyoaktif özellikleri coğrafi/bölgesel kökene, iklim değişikliklerine ve/veya ekstraksiyon yöntemine göre değişiklik göstermektedir (Odunkiran vd. 2021, Sawicki vd. 2022). Bu nedenle literatürde aynı arı ürünleri için farklı değerler gözlenmesi olasıdır. Bu koşullar göz önüne alındığında, literatürdeki farklı arı ürünlerinin IC₅₀ değerlerinin çalışmamızdaki krem formülasyonları ile yakın sonuç verdiği görülmektedir.

Sonuç

Çalışma sonuçları propolis ve arı sütü ile zenginleştirilen krem formülasyonunun biyoaktif bileşenler içerdiği ve bu sayede antioksidan, anti-hyaluronidaz ve antimikrobiyal gibi çok amaçlı aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Yapısı nedeniyle hızlı bozulabilen ve okside olabilen arı sütünün propolis ile kullanılması, arı sütünün kozmetik ürünlerindeki bozulmaya karşı dayanımını artırmıştır. Stabilité sonuçları kremlerin emülsiyon yapısı ve görünümünün farklı depolama sıcaklık şartlarında değişmeden kaldığını ve hiçbir şekilde faz ayrımı belirtisi göstermediğini ortaya koymuştur. Ayrıca propolis ve arı sütü içeren krem formülasyonunun geliştirilmesine yönelik yaptığımız bu çalışma ön çalışma niteliği taşımakta olup benzer içeriğin cilt yenileyici ve kırışıklık giderici kozmetik ürünlerinde ve *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis* ve *C. albicans*'in neden olduğu çeşitli deri hastalıklarının tedavisine yönelik cilt ürünlerinde kullanılabilirliğini kanıtlamıştır.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Teşekkür: Desteklerinden ötürü TÜBİTAK 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programına teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Durumu: Bu araştırma için etik kurul belgesi gerekli değildir.

Mali Kaynak: Bu çalışma Zeynep Berin ÇELEBİ'nin lisans bitirme tezinden üretilmiş olup TÜBİTAK 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

Veri Sağlama: Mevcut çalışma sırasında kullanılan ve/veya analiz edilen tüm veriler ve materyaller bu makalede mevcuttur.

Yazar Katkıları: Yazar Zeynep Berin ÇELEBİ çalışmadaki analizlerin gerçekleştirilmesine katkı sağlamıştır. Diğer bütün yazarlar analizlerin gerçekleştirilmesi, verileri düzenlenmesi, makale yazımı ve revizyonuna eşit katkıda bulunmuşlardır.

KAYNAKLAR

Atagün ÖS. Periodontal hastalıkların tedavisinde hiyalüronik asit. Sağlık & Bilim: Medikal Araştırmalar, 2022;3:75

Balkan IA, Doğan HT, Zengin G, Colak N, Ayaz FA, Gören AC, Kırmızıbekmez H, Yeşilada E. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of Nerium oleander L. flower extracts and activity guided isolation of the active components. Industrial Crops and Products, 2018;112:24-31

Bankova V, Popova M, Trusheva B. New emerging fields of application of propolis. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2016;35(1):1-11

Bărnuțiu LI, Mărghitaș LA, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiș O. Chemical composition and antimicrobial activity of Royal Jelly-review. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 2011;44(2):67-72

Belmehti O, El Menyiy N, Bouyahya A, El Baaboua A, El Omari N, Gallo M vd. Recent advances in the chemical composition and biological activities of propolis. Food Reviews International, 2023 1-51

Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Ed. Packer L, "In Methods in enzymology" Academic press, Orlando, 1999, pp. 15-27

Can Z. Determination of in-vitro antioxidant, anti-urease, anti-hyaluronidase activities by phenolic rich bee products from different region of Turkey. Fresenius Environ. Bull, 2018;27:6858-6866

Can Z, Kara Y, Kolaylı S, Çakmak İ. Antioxidant activity and phenolic composition of propolis from Marmara region, Turkey. Journal of Apicultural Research, Published online DOI: 10.1080/00218839.2022.2157582

Chaiwong N, Phimolsiripol Y, Leelapornpisid P, Ruksiriwanich W, Jantanasakulwong K, Rachtanapun P vd. Synergistics of carboxymethyl chitosan and mangosteen extract as enhancing moisturizing, antioxidant, antibacterial, and deodorizing properties in emulsion cream. Polymers, 2022;14(1):178.

Civelek İ. Biological activities of royal jelly: a mini-review. Anatolian Journal of Biology.2022;3(1):1-8

Dini I, Laneri S. The new challenge of green cosmetics: Natural food ingredients for cosmetic formulations. Molecules, 2021;26(13):3921

Dizman S, Yıldız O, Boyracı GM, Kolaylı S. Determination of natural radioactivity levels and gamma radiation attenuation coefficients in propolis samples and the study of its antioxidant properties. Radiochimica Acta, 2020;108(10):829-837

Dorken EA. Bitkisel ve mikroalg içerikli kremlerin geliştirilmesi, antioksidan ve anti-tirosinaz enzim aktivitelerinin analitik yöntemlerle araştırılması. BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa, 2022, (erişim tarihi:20.05.2023), <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

FDA-BAM. Aerobic plate count. In "FDA's Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>. 2001a, (erişim tarihi:18.08.2023)
- FDA-BAM. Yeasts, moulds and mycotoxins. In "FDA's Bacteriological Analytical Manual, Chapter 18, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>.2001b. (erişim tarihi:18.08.2023)
- Fitzner A, Knuhr K, Brandt M, Bielfeldt S. Investigating the effect of the pH of foot care product formulations on pedal skin in diabetic and non-diabetic subjects. *International Journal of Cosmetic Science*, 2023
- Girish KS, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath BS. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 2009;16(18):2261-2288
- Hotaman HE. Anzer bal ve polenin bazı biyoaktif özelliklerinin in vitro olarak incelenmesi. RTE Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Rize, 2015, (erişim tarihi.20.05.2023) <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSoргуSonucYeni.jsp>
- Imam S, Azhar I, Perveen S, Hussain SG, Mahmood ZA. Studies on in vitro antioxidant activity and total flavonoid contents of a cream formulation to correlate its anti-aging effect. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2015;4(1):1646-1655
- Kara Y. Fenolik bileşiklerin RP-HPLC-PDA ile analiz yöntemi geliştirilmesi, validasyonu ve etanolik propolis özütlerine uygulanması. KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2020, (erişim tarihi. 20.08.2023), <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSoргуSonucYeni.jsp>
- Kolaylı S, Birinci C, Kara Y, Ozkok A, Samancı AET, Sahin H. vd. A melissopalynological and chemical characterization of Anatolian propolis and an assessment of its antioxidant potential. *European Food Research and Technology*, 2023;249(5):1213-1233
- Kolaylı S, Sahin H, Can Z, Yıldız O, Sahin K. Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2016;31(4):599-602
- Kowalczyk I, Gębski J, Stangierska D, Szymańska A. Determinants of Honey and other bee products use for culinary, cosmetic, and medical purposes. *Nutrients*, 2023;15(3):737
- Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 2020;25(3):556
- Lee J, Hyun CG. Natural Products for Cosmetic Applications. *Molecules*, 2023;28(2):534
- Mapoung S, Semmarath W, Arjsri P, Umsumarn S, Srisawad K, Thipraphan P, vd. Determination of phenolic content, antioxidant activity, and tyrosinase inhibitory effects of functional cosmetic creams available on the Thailand market. *Plants*, 2021;10(7):1383
- Muriel-Galet V, Cran MJ, Bigger SW, Hernández-Muñoz P, Gavara R. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, 2015;149:9-16
- Nosheen S, Kaleem M. Recovery optimization of plant waste derived antioxidants and their incorporation in cosmetic creams to enhance antioxidant potential: A cost-effective approach. *Research Square*, 2023, preprint
- Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2015;26(2):165-170
- Odunkiran A, Şengül M, Ufuk S. Some Characteristics of Honey and Propolis and Their Effects on Covid-19. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2021;4(2):129-153
- Olczyk P, Komosinska-Vassev K, Wisowski G, Mencner L, Stojko J, Kozma EM. Propolis Modulates Fibronectin Expression in the Matrix of Thermal Injury. *Biomedical Research*. Int. 2014;748101
- Ordu JI, Sunday BR, Okafo SE. Evaluation of the activity of Garcinia kola seed oil and honey on

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- skin cream formulation. *The Pharma Innovation*, 2018;7(5, Part J):675
- Papaemmanouil CD, Peña-García J, Banegas-Luna AJ, Kostagianni AD, Gerothanassis, IP, Pérez-Sánchez, H vd. ANTIAGE-DB: A database and server for the prediction of anti-aging compounds targeting elastase, hyaluronidase, and tyrosinase. *Antioxidants*, 2022;11(11):2268
- Pavel CI, Mărghitaş L A, Bobiş O, Dezmirean DS, Şapcaliu A, Radoi I, vd. Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 2011;44(2):108-118
- Polat A, Akdeniz H, Turhan M. Arı ürünü olan propolis' in yapısı ve özellikleri. *Uluslararası Gıda Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2023;3(1):55-63
- Rocha VM, Portela RD, dos Anjos JP, de Souza CO, Umsza-Guez MA. Stingless bee propolis: composition, biological activities and its applications in the food industry. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2023;5(1):1-13
- Sá SHG, Mazzocato MC, Saliba ASM, Alencar SM, Favaro-Trindade, CS. Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. *Food Research International*, 2023;164:112423
- Sawicki T, Starowicz M, Kłębukowska L, Hanus P. The profile of polyphenolic compounds, contents of total phenolics and flavonoids, and antioxidant and antimicrobial properties of bee products. *Molecules*, 2022;27(4):1301
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 1977;28(1):49-55
- Sonika P, Akanksha S, Rajesh T, Sunita S, Suman S. Development and evaluation of antimicrobial herbal cosmetic preparation. *African journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2014;8(20):514-528
- Sönmez E. Investigation of chemical content and antimicrobial activities of different plant sources of Anatolian propolis samples. *U. Arı D.-U. Bee J.*, 2023;23(1):37-48
- Srisuksomwong P, Kaenhin L, Mungmai L. Collagenase and tyrosinase inhibitory activities and stability of facial cream formulation containing cashew leaf extract. *Cosmetics*, 2023;10(1):17
- Tanuğur Samancı AE, Kekeçoğlu M. Development of a cream formulation containing bee venom and other bee products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2022;21(10):4913-4920
- TİTCK. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kontrolüne ilişkin kılavuz. <https://www.titck.gov.tr/mevzuat/kozmetik-urunlerin-mikrobiyolojik-kontrolune-iliskinkilavuz-surum-1-0-27122018172953>, 2023, (erişim tarihi: 15.08.2023)
- Tranggono RI, Latifah F. *Cosmetic Science Handbook*. PT Gramedia, Jakarta, Indonesia, 2007, p.11-32
- Turkut GM, Er M, Değirmenci A. Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of Turkish propolis extracts prepared with various solvents. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2019;2(1):7-11
- Yahaya YA, Don MM. Evaluation of *Trametes lactinea* extracts on the inhibition of hyaluronidase, lipoxxygenase and xanthine oxidase activities in vitro. *Journal of Physical Science*, 2012;23:1-15
- Yasin A, Ren Y, Li J, Sheng Y, Cao C, Zhang K. Advances in hyaluronic acid for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022;10:910290
- Yıldız O. Tüketilebilir propolis ekstralarında kullanılan çözücülerin (menstrumların) değerlendirilmesi. *U. Arı D.-U. Bee J.* 2020;20(1):24-37
- Yıldız O, Boyracı GM. Production and some quality parameters of sugar beet sweets (Pestil and Köme). *Sugar Technology*, 2020;22(5):842-852
- Yorgancıoğlu A. Bazı uçucu yağlarla kollajen içerikli antimikrobiyal krem üretilebilirliği üzerine araştırmalar. *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir*, 2012, (erişim tarihi: 21.08.2023)